

**Interaktion zwischen Metronidazol und  
parodontopathogenen Bakterien  
im Zusammenhang mit KB-Zellen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA

von Daniela Stephan  
geboren am 10. Juni 1978 in Potsdam

Gutachter:

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP	Aggressive Parodontitis
ATCC	American type culture collection
CDT	cytolethal distending toxin
CP	Chronische Parodontitis
CXC	Cystein-X-Cystein
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
EMEM	eagle minimum essential medium
FCS	Fetales Kälberserum
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAM-1	junctional adhesion molecule 1
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KGP	Lysinspezifische Cysteinproteasen
LAP	Lokalisierte aggressive Parodontitis
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIP-1- $\alpha$	Monozytenchemotaktisches Protein 1 $\alpha$
MMP	Matrix-Metallproteinasen
OD	Optische Dichte
PAF-Rezeptor	platelet-activating-factor-receptor
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung)
PMNs	Polymorphkernige Granulozyten
PRPs	Prolinreiche Proteine
PRP-C	kollagenolytische Protease
RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed

---

RGPA	Argininspezifische Cysteinproteasen
RGPB	Argininspezifische Cysteinproteasen
RTX-Toxin	repeat in toxin
TBS	tris-buffered saline
TLCK	N- $\alpha$ -toxyl-L-lysine chloromethylketone
TMB-Substrat	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TGF	transforming growth factor
TIMPs	tissue-inhibitor of metallo proteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
VPE	vascular permeability enhancement factors

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1	Klassifikation der parodontalen Erkrankungen . . . . .	7
2.2	Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis . . . . .	8
2.3	Zytokine in der parodontalen Erkrankung . . . . .	10
2.4	Charakteristik ausgewählter parodontopathogener Bakterien . . . . .	14
2.5	Interaktionen zwischen parodontopathogenen Bakterien und oralen Epithelzellen . . . . .	18
2.6	Therapie der parodontalen Erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung des Metronidazols . . . . .	23
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
4.1	Bakterienstämme und minimale Hemmkonzentration des Metronidazols . .	29
4.2	KB-Zellen . . . . .	29
4.3	Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol . . . . .	30
4.4	Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol . . . . .	34
4.5	Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion . . . . .	35
4.6	Nachweis der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta_1$ und TNF $\alpha$ . . . . .	35
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
5.1	Zahl der adhärenenten, invasiven und frei vorkommenden Bakterien . . . . .	38
5.1.1	Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol . . . . .	38
5.1.2	Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol . . . . .	42
5.1.3	Zugabe des Metronidazols bei Infektion der Zellen . . . . .	45

5.2	Auswertung der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta_1$ und TNF- $\alpha$ . . . . .	48
5.2.1	Interleukin-8 . . . . .	48
5.2.2	TGF- $\beta_1$ . . . . .	51
5.2.3	IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ . . . . .	54
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
6.1	Methodik . . . . .	55
6.2	Wirkung des Metronidazols auf adhärente, invasive und freie Bakterien von Porphyromonas gingivalis und Actinobacillus actinomycetemcomitans . . .	58
6.3	Beeinflussung der Freisetzung von Zytokinen aus KB-Zellen durch Metro- nidazol und die Bakterien . . . . .	65
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>72</b>
	<b>Anhang</b>	<b>74</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>74</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>92</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Bakterien *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* werden im Zusammenhang mit aggressiven und schweren chronischen Parodontitiden gesehen. Sie verfügen über die Fähigkeiten der Adhärenz und Invasion an bzw. in Epithelzellen. Der Aufenthalt innerhalb des zellulären Kompartiments schützt die Bakterien vor der Eliminierung durch die Immunabwehr des Wirtes und vor der keimabtötenden Wirkung antibakterieller Medikamente. In der Pathogenese parodontaler Erkrankungen spielen bei den Wechselwirkungen zwischen Wirtszellen und Bakterien auch Zytokine, zelluläre Botenstoffe, eine wichtige Rolle, da sie sowohl inflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen aufweisen. Die Beeinflussung der Zytokinfreisetzung durch Medikamente könnte ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung von neuen Behandlungsstrategien bei parodontalen Erkrankungen sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Interaktionen zwischen dem in der Parodontitistherapie etablierten Medikament Metronidazol und parodontopathogenen Bakterien im Zusammenhang mit Epithelzellen im Rahmen einer In-vitro-Studie zu untersuchen. Dabei sollte die Wirkung des Metronidazols auf freie, adhärente und invasive Bakterien im Hinblick auf die Problematik der chronischen Parodontitis, bei der invasive parodontopathogene Bakterien eine Rolle spielen, untersucht werden. Im Rahmen der Untersuchungen war auch von großem Interesse, ob und in welchem Ausmaß Metronidazol sowie parodontopathogene Bakterien die Freisetzung von Zytokinen aus KB-Zellen hemmen oder fördern.

Sämtliche Versuche wurden an sogenannten KB-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um Epithelzellen einer permanenten Zellreihe. Als Bakterienstämme wurden *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 sowie *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 verwendet. Die Untersuchungen an den KB-Zellen wurden mit jeweils drei verschiedenen Einwirkzeiten durchgeführt: 1 h, 6 h und 18 h. In einem ersten Versuch wurden zunächst die Zellen für eine Stunde mit Metronidazol inkubiert, nach Waschschritten wurden die Zellen mit den Bakterien infiziert. Die Inkubation erfolgte in allen Versuchen mit folgenden Metronidazolkonzentrationen: 0,25 MHK, 10 µg/ml und 100 µg/ml. Im zweiten Versuch wurden die Bakterien eine Stunde lang mit Metronidazol versehen und anschließend die Zellen mit den Bakterien infiziert. Im letzten Versuch erfolgte die Zugabe des Metronidazols zu

den Zellen zum Zeitpunkt der Infektion. Anschließend wurden freie, adhärenente und invasive Bakterien angezüchtet sowie der Zellüberstand im ELISA-Verfahren auf die Konzentration verschiedener Zytokine untersucht.

Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass Metronidazol selbst in der Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  keine keimabtötende Wirkung auf die Bakterien in Kontakt mit KB-Zellen hatte. Es konnten nur geringe Wirkungsunterschiede bei freien, adhärenenten oder invasiven Bakterien evaluiert werden. Die Inkubation der Zellen mit Metronidazol führte zu einer erhöhten Freisetzung von IL-8. Bei allen Versuchsreihen mit *A. actinomycetemcomitans* wurde IL-8 nach 6 h und 18 h in erhöhten Konzentrationen (bis 400 pg/ml) nachgewiesen, wobei ein Zusammenhang mit der Metronidazolkonzentration bestand. Nach Infektion mit *P. gingivalis* wurde IL-8 nur nach Zugabe zum Infektionszeitpunkt und bei einer Metronidazolkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  detektiert. IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  konnten nie nachgewiesen werden. Die Konzentrationen von TGF- $\beta_1$  waren kurzzeitig nach Zugabe des Metronidazols leicht erhöht, ein eindeutiges Ergebnis konnte jedoch nicht erzielt werden.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass die Interaktion zwischen Bakterien und KB-Zellen Einfluss auf die keimabtötende Wirkung von Metronidazol hat. Aufgrund der Tatsache, dass weder *A. actinomycetemcomitans* noch der zuvor sensibel getestete *P. gingivalis* durch Metronidazol eliminiert wurde, sollte die Verwendung von Metronidazol bei der Behandlung von aggressiven bzw. schweren chronischen Parodontitiden kritisch bewertet werden. Die erhöhte IL-8-Freisetzung könnte die unspezifische Immunantwort stimulieren.



## 2 Einleitung

Die Parodontitis ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des Menschen (Henderson et al. 2003). Hauptmerkmal der parodontalen Entzündung ist ein irreversibler Abbau des Alveolarknochens, dessen Folge der Verlust von Zähnen sein kann.

In der Bundesrepublik Deutschland sind etwa 85 % der erwachsenen Bevölkerung von einer parodontalen Erkrankung betroffen. Aggressive Formen dieser Erkrankung mit schwerem Krankheitsverlauf werden bei ca. 10 % der Patienten gefunden. Diese Zahlen machen deutlich, warum es so wichtig ist, dass alle Anstrengungen unternommen werden, parodontale Erkrankungen zu erforschen und das dabei gewonnene Wissen zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien zu nutzen. Auch diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten.

### 2.1 Klassifikation der parodontalen Erkrankungen

Seit 1999 werden die parodontalen Erkrankungen nach einer neuen Nomenklatur unterteilt (Armitage 1999). Wir unterscheiden heute:

#### 1. Gingivitiden

- durch Plaque induzierte Gingivitiden
- nicht durch Plaque induzierte Gingivitiden

#### 2. Chronische Parodontitis

- lokalisiert
- generalisiert

#### 3. Aggressive Parodontitis

- lokalisiert
- generalisiert

#### 4. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen

- hämatologische Erkrankungen

- genetische Erkrankungen
5. Nekrotisierende parodontale Erkrankungen
    - nekrotisierende ulzerierende Gingivitis
    - nekrotisierende ulzerierende Parodontitis
  6. Abszesse des Parodonts
  7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
  8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände

In der neuen Nomenklatur wurde der Bezug der Erkrankung zum Alter des Patienten aufgegeben. Die Formen “Adulte Parodontitis”, “Lokalisierte juvenile Parodontitis” und “Rasch progressive Parodontitis” werden demnach in der neuen Nomenklatur nicht mehr verwendet und zum Teil durch andere Begriffe ersetzt: der aus der alten Nomenklatur stammende Begriff “Adulte Parodontitis” wurde in der neuen Nomenklatur durch “Chronische Parodontitis” (CP) ersetzt. Ebenso wird statt “Rasch progressive Parodontitis” heute die Bezeichnung “Aggressive Parodontitis” (AP) verwendet. Außerdem wird anstelle von “Lokalisierte juvenile Parodontitis” der Begriff “Lokalisierte aggressive Parodontitis” (LAP) benutzt.

## 2.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Entzündliche parodontale Erkrankungen werden von einer Reihe vorwiegend gramnegativer, mikroaerophiler bzw. anaerober Bakterien verursacht, die der Mikroflora der subgingivalen Plaque angehören. Im Konsensusbericht von Genco et al. (1996) wurden als Hauptvertreter dieser sogenannten parodontopathogenen Bakterien *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythensis* (früher: *Bacteroides forsythus*) genannt. Page und Kornman (1997) gingen noch einen Schritt weiter und führten in ihrem Artikel über die Pathogenese der Parodontitis aus, dass die Bakterien zwar eine wichtige Voraussetzung für die Erkrankung darstellen, allein jedoch keine Parodontitis verursachen können. Die Entstehung, das Ausmaß und der Verlauf der Erkrankung ist von einer Vielzahl sowohl exogener als auch endogener Wirtsfaktoren abhängig. Aus diesem Grund wird die Parodontitis heute als multifaktorielle Erkrankung angesehen.

Schlechte Mundhygiene, Rauchen, Stress sowie Diabetes mellitus fördern unter anderem die Progression von parodontalen Erkrankungen und werden daher als Risikofaktoren angesehen (Mueller 2001).

Voraussetzung für die Entstehung einer Parodontitis ist eine Gingivitis. Die gingivale Entzündung ist in den meisten Fällen plaqueassoziiert. Bei unregelmäßiger und ineffizienter Plaqueentfernung kommt es zu einer Veränderung der in der Plaque lebenden Bakterien, es tritt eine "Plaquereifung" ein, die mit einer Zunahme der anaeroben Bakterien vergesellschaftet ist. Aus einer chronischen Gingivitis kann sich in einem zeitlichen Rahmen von Monaten oder Jahren eine Parodontitis entwickeln.

Zusätzlich zur Veränderung der Plaquezusammensetzung kommt es nach einigen Wochen neben der supragingivalen Plaque zur Ausbildung einer subgingivalen Plaque. Eine Auswirkung der durch die Bakterien induzierten Entzündung ist die Apikalproliferation des Saumepithels, die zur Ausbildung einer parodontalen Tasche führt. Dabei wandelt sich das Saumepithel in ein Taschenepithel um. Weiterhin kommt es zum Abbau des parodontalen Bindegewebes und des Alveolarknochens, woraus ein Attachmentverlust resultiert (Mueller 2001). In diesem Stadium ist eine Heilung des Gewebes ohne Therapie erst bei Exfoliation des Zahnes möglich.

Auf der zellulären Ebene werden durch bakterielle Schadstoffe vielfältige Prozesse ausgelöst, die das katabol-anabole Gleichgewicht im Gewebe stören und somit zum Abbau parodontaler Strukturen führen. Die verursachenden pathogenen Bakterien können dabei sowohl direkt über zytotoxische Stoffwechselprodukte als auch indirekt über die Aktivierung der körpereigenen Abwehrreaktion zur Zerstörung des Gewebes beitragen. So wird zum Beispiel durch von Bakterien gebildete und freigesetzte Enzyme wie Hyaluronidasen oder Kollagenasen oder auch durch bakterielle Toxine der direkte Abbau parodontaler Strukturen verursacht. Andererseits haben spezielle Zellwandstrukturen, die als Endotoxine oder auch Lipopolysaccharide bezeichnet werden, ein hohes immunologisches Potential und verursachen eine starke Immunantwort des Wirtes. Da die Bekämpfung der Bakterien durch immunkompetente Zellen des Wirtorganismus gleichzeitig auch zur Destruktion parodontaler Gewebe führt, werden Bakterien auch als indirekte Zerstörer des Parodonts angesehen (Teng 2003, Sanderink et al. 2004).

Parodontopathogene Bakterien wenden verschiedene Strategien an, um die Epithelbarriere des Sulkusepithels zu überwinden und ins parodontale Bindegewebe zu gelangen. *A. actinomycetemcomitans* ist zum Beispiel in der Lage, in Epithelzellen einzudringen und von Epithelzelle zu Epithelzelle “springend” das parodontale Bindegewebe zu erreichen (Meyer et al. 1996). Eine weitere Methode besteht darin, dass proteolytisch wirkende Enzyme parodontopathogener Bakterien, z. B. Hyaluronidasen und Kollagenasen, die Epithelbarriere angreifen. Dazu schwächen sie zunächst die Haftungsproteine zwischen den Epithelzellen und lösen die Basalmembran auf. Damit sind sie in der Lage, Kollagen und Matrixbestandteile innerhalb des Bindegewebes zu denaturieren und eröffnen in der Folge weiteren bakteriellen Schadstoffen und Bakterien die Möglichkeit, ungehindert die Epithelbarriere zu überwinden und ins Innere des Gewebes zu gelangen (Katz et al. 2000, Hintermann et al. 2002, Potempa et al. 2000).

Da Lipopolysaccharide (LPS) nach dem Eindringen in das parodontale Gewebe eine starke Immunreaktion auslösen, werden sie als wichtige Virulenzfaktoren angesehen (Wilson 1995). Auf zellulärer und auf humoraler Ebene versucht das Abwehrsystem, die eingedrungenen Schadstoffe und Bakterien zu eliminieren. Dabei greifen in der ersten Phase der Entzündung Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Wichtige Agonisten sind dabei polymorphkernige Granulozyten (PMNs). Dabei handelt es sich um phagozytierende Zellen, die Bakterien durch oxidative und nichtoxidative Mechanismen abtöten können (Miyasaki 1991). Das erworbene Immunsystem tritt nach einer Latenzzeit von 6-7 Tagen in Aktion. Eine bedeutende Funktion haben dabei Lymphozyten, die die Bakterien durch Antikörper opsonieren und vernichten können.

Die Abstimmung und Koordination der Immunreaktionen wird durch Kommunikationsprozesse zwischen den Zellen ermöglicht. Dabei spielen zelluläre Botenstoffe, sogenannte Zytokine, eine wichtige Rolle.

## **2.3 Zytokine in der parodontalen Erkrankung**

Zytokine sind lösliche, niedrigmolekulare Proteine, die von verschiedenen Zelltypen des Wirtsorganismus sezerniert werden und der Regulation von Zellfunktionen dienen. Verschiedene Untergruppen der Zytokine sind bekannt: Interleukine, Chemokine, Wachstumsfakto-

ren, Tumornekrosefaktoren, koloniestimulierende Faktoren sowie Interferone. Zytokine greifen als Protagonisten und Antagonisten in die Aktivierung, Proliferation und Hemmung verschiedener Effektorzellen ein (Seymor und Gemmell 2001). Sie sind sowohl an der Regulation der angeborenen als auch der erworbenen Immunabwehr beteiligt (Sandros et al. 2000). Aufgrund ihrer Beteiligung bei der Koordination von Entzündungsvorgängen hat die Erforschung von Zytokinen einen wichtigen Stellenwert in der Parodontologie.

Nach Bindung der Zytokine an spezifische Zellmembranrezeptoren erfolgt innerhalb der Zelle eine Signaltransduktion, wobei es dabei zum An- oder Abschalten eines Gens und in der Folge zur Produktion eines Proteins kommen kann. Die Wirkung von Zytokinen tritt bereits bei geringsten Konzentrationen auf. Zytokine können ein Netzwerk ausbilden, indem sie sowohl die Bildung von Zytokinen als auch die Expression ihrer Rezeptoren aktivieren oder hemmen können (Balkwill und Burke 1989).

Große Bedeutung für die Parodontologie haben die im Nachfolgenden näher beschriebenen Interleukine (IL): IL-1, IL-6 und IL-8, der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und der transforming-growth-factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ).

Interleukin-1 (IL-1) ist ein proinflammatorisches Zytokin mit regulierender Wirkung auf die Expression verschiedener Gene, die in Entzündungsvorgänge involviert sind (Graves und Cochran 2003). Im Rahmen von entzündlichen Prozessen werden viele Immunreaktionen und Gewebeabbauprozesse durch die Wirkung von IL-1 moduliert (Okada und Murakami 1998).

Das Interleukin-1 System besteht aus drei Liganden: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-1ra sowie zwei membrangebundenen Rezeptoren: IL-1 R1 und IL-1 R2. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  binden beide an den Rezeptor IL-1 R1 und haben ähnliche biologische Wirkungen. IL-1 ra kann auch an IL-1 R1 binden, allerdings wird dadurch kein biologisches Signal getriggert, sondern IL-1 ra wirkt als kompetitiver Antagonist der beiden anderen Formen (Graves und Cochran 2003).

IL-1 wird insbesondere von aktivierten Makrophagen, polymorphkernigen Granulozyten, Lymphozyten, Endothel- und Epithelzellen, gingivalen und desmodontalen Fibroblasten und Knochenzellen synthetisiert. Seine Hauptwirkung entfaltet sich auf Endothelzellen, die durch IL-1 zur Expression von Adhäsionsmolekülen angeregt werden. An diese können im Verlauf der angeborenen Immunabwehrreaktion polymorphkernige Granulozyten binden, nachfol-

gend durch die Gefäße hindurchtreten und zum Ort der Entzündung migrieren (Gemmell et al. 1997). IL-1 ist auch bei Vorgängen, die zur Zerstörung des parodontalen Gewebes und zum Knochenabbau führen, beteiligt (Birkedal-Hansen 1993).

Eine klinische Studie hat gezeigt, dass bei experimenteller Gingivitis eine erhöhte Konzentration von IL-1 auftritt (Kinane et al. 1992). Außerdem wiesen gingivale Biopsien von Patienten mit progressivem Attachmentverlust eine höhere Konzentration von IL-1 $\beta$  als Biopsien von Patienten mit gesundem Parodont oder aus stabilen Läsionen auf (Stashenko et al. 1991). Aufgrund der Ergebnisse dieser Studien wird IL-1 als Marker für parodontale Erkrankungen angesehen.

Interleukin-6 (IL-6) wird von einer Reihe verschiedener Zellen synthetisiert. Dabei wird der größte Anteil von aktivierten Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen freigesetzt, jedoch sind auch stimulierte Makrophagen, T- und B-Zellen an der Produktion von IL-6 beteiligt (Okada und Murakami 1998). In entzündeter Gingiva ist die Konzentration von IL-6 höher als in gesunder Gingiva (Bartold und Haynes 1991). IL-6 beeinflusst sowohl die Immunantwort als auch Entzündungsreaktionen (Okada und Murakami 1998). An der Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen ist IL-6 maßgeblich beteiligt (Okada und Murakami 1998). Die in parodontalen Läsionen beobachtete klonale Expansion von Plasmazellen könnte auf die Wirkung von IL-6 zurückgehen (Fujihashi et al. 1993). Weiterhin spielt IL-6 eine bedeutende Rolle im Knochenstoffwechsel, wobei es die Anzahl der Osteoklasten erhöht und somit die Knochenresorption stimuliert (Takahashi et al. 1992).

Interleukin-8 (IL-8) wird in die Gruppe der Chemokine eingeordnet und führt zur chemotaktischen Anlockung von polymorphkernigen Granulozyten entlang eines Konzentrationsgradienten an den Ort seines mengenmäßig höchsten Auftretens (Bickel 1993). Die biologische Wirkung von IL-8 auf PMNs scheint dosisabhängig zu sein. Niedrige Konzentrationen von IL-8 stimulieren ihre Migration, höhere Konzentrationen dagegen führen zur Aktivierung ihrer antibakteriellen Mechanismen (Kornman et al. 1997). Somit ist IL-8 an der Aktivierung des unspezifischen Abwehrsystems beteiligt. Außerdem konnten angiogenetische Wirkungen von IL-8 nachgewiesen werden, wobei IL-8 bei Wundheilungsvorgängen und dem Wachstum von Tumoren festgestellt wurde. Möglicherweise ist IL-8 auch an Zellproliferationsvorgängen beteiligt (Sfakianakis et al. 2002).

IL-8 wird von einer Reihe verschiedener Zellen sezerniert, unter anderem von Monozyten, Fibroblasten, Lymphozyten sowie Epithel- und Endothelzellen (Okada und Murakami 1998, Sfakianakis et al. 2002). Parodontogene Bakterien induzieren die Sezernierung von IL-8 bei gingivalen Keratinozyten (Sfakianakis et al. 2002). Die Konzentration von IL-8-mRNA korrespondiert mit dem Schweregrad parodontaler Erkrankungen (Tonetti et al. 1994).

IL-8 gehört zur Cystein-X-Cystein (CXC) Chemokinsubfamilie (Sfakianakis et al. 2001). Rezeptoren, die CXC-Chemokine binden, werden CXCR genannt und durch eine Nummer gekennzeichnet. Es sind zwei Rezeptoren für IL-8 bekannt: CXCR-1 und CXCR-2. Während CXCR-1 eine hohe Spezifität für IL-8 aufweist, bindet CXCR-2 auch andere Chemokine (Sfakianakis et al. 2002).

Der transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) wurde erstmals aus humanen Plazentazellen, Thrombozyten und Rinderniere gewonnen (Hefti 1993). Alle bisher untersuchten Zellen bilden TGF- $\beta_1$  (Okada und Murakami 1998). Die Subtypen TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  und TGF- $\beta_3$  werden durch verschiedene Gene codiert, wobei sieben verschiedene Polymorphismen für das Gen von TGF- $\beta_1$  festgestellt werden konnten (Cambien et al. 1996). In einer weiteren Studie wurden fünf dieser Polymorphismen hinsichtlich ihrer Bedeutung als Risikofaktor der Erwachsenenparodontitis untersucht, ohne dass ein Zusammenhang nachgewiesen werden konnte (Holla et al. 2002).

TGF- $\beta_1$  spielt eine zentrale Rolle in der Regeneration des parodontalen Gewebes und wird als direkter Antagonist von IL-1 angesehen (VanderZee und Beertsen 1997). Als anti-inflammatorisches Zytokin induziert TGF- $\beta_1$  die Bildung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix des Bindegewebes wie z. B. Kollagen, Fibronektin, Proteoglykan, Glykosaminoglykan, Osteonectin und Osteopontin in verschiedenen Zelltypen (Okada und Murakami 1998). Außerdem hemmt TGF- $\beta_1$  den Abbau von Kollagen durch Inhibierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Förderung ihrer Antagonisten, der tissue inhibitors of metallo proteinases (TIMPs) (Holla et al. 2002). Weiterhin ist TGF- $\beta_1$  der bekannteste Wachstumshemmer von Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, neuronalen Zellen, Lymphozyten und Hepatozyten (Okada und Murakami 1998).

Bei Patienten mit parodontalen Entzündungen konnten erhöhte Konzentrationen von TGF- $\beta_1$  sowohl im parodontalen Gewebe als auch in der Sulkusflüssigkeit gemessen werden

(Steinsvoll et al. 1999).

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist ein synergetisch zu IL-1 wirkendes proinflammatorisches Zytokin. Es wird von verschiedenen Zellen, darunter Monozyten, Makrophagen, PMNs, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen sowie Osteoblasten gebildet. TNF- $\alpha$  stimuliert die Bildung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen, induziert die Bildung von Prostaglandinen und ist somit an der Initiation von Entzündungsprozessen beteiligt. Des Weiteren aktiviert TNF- $\alpha$  Osteoklasten und trägt dadurch zum Abbau des Alveolarknochens bei. Zudem führt die durch TNF- $\alpha$  induzierte Expression von Matrix-Metalloproteinasen zum Abbau des parodontalen Bindegewebes (Graves und Cochran 2003).

## 2.4 Charakteristik ausgewählter parodontopathogener Bakterien

*Porphyromonas gingivalis* ist ein unbewegliches gramnegatives Bakterium mit stäbchenförmiger Morphologie, das anaerobe Umweltbedingungen für sein Wachstum benötigt. *P. gingivalis* wird vor allem als Verursacher von schweren Formen der chronischen Parodontitis angesehen (Slots und Ting 1999).

*P. gingivalis* produziert eine Reihe verschiedener proteolytisch wirkender Enzyme, welche auch Proteasen genannt werden. Unter allen parodontopathogenen Bakterien weist *P. gingivalis* mit Abstand die größte proteolytische Aktivität auf (Eley und Cox 2003, Courant und Bader 1966). Die Proteasen dienen unter anderem der Aufspaltung von Proteinen zum Zweck der Nahrungsgewinnung. Sie werden als wichtige Virulenzfaktoren angesehen, da sie das Wachstum von *P. gingivalis* ermöglichen und zu einer Zerstörung des Wirtsgewebes führen (Loesche et al. 1985). Die Proteasen unterscheiden sich in ihrer Größe, dem optimalen pH-Bereich, der Sensibilität gegenüber Inhibitoren, sowie ihrer Fähigkeit, spezifische Substrate zu spalten. Variationen gibt es auch im Hinblick auf ihre Lokalisation innerhalb der Bakterienzelle beziehungsweise an ihrer Oberfläche (Lawson und Meyer 1992).

Spezielle Cysteinproteasen mit trypsinähnlicher Wirkung, die Gingipaine, sind für 85 % der proteolytischen Aktivität von *P. gingivalis* verantwortlich (Potempa et al. 1997, Potempa et al. 1995). Anhand des Aminosäurerestes, an dem diese Proteasen Proteine aufspalten, werden Arginin- und Lysin-Gingipaine unterschieden (Pike et al. 1994). Dabei werden die Bezeichnungen RGPA und RGPB für argininspezifische Cysteinproteasen sowie KGP für



lysinspezifische Cysteinproteasen verwendet. RGPA und RGPB aktivieren die Gerinnungsfaktoren IX (Imamura et al. 2001b), X (Imamura et al. 1997) und Prothrombin (Gerinnungsfaktor II) (Imamura et al. 2001a) und beschleunigen auf diesem Weg die Gerinnung des Plasmas. Einen gegensätzlichen Effekt ruft KGP hervor: Durch die Denaturierung von Fibrin und Fibrinogen kommt es zu einer Verlängerung der Blutungszeit (Imamura et al. 1995). Es konnte bei Parodontitispatienten nachgewiesen werden, dass die Blutungstendenz mit der Anwesenheit von *P. gingivalis* in der parodontalen Tasche korreliert (Albandar et al. 1990). Über die Hämolyse ist *P. gingivalis* in der Lage, an die für ihn wichtigen Wachstumsfaktoren Häm und Eisen zu gelangen.

Die Spaltung wirtseigener Funktionsproteine durch Gingipaine führt einerseits zu deren Hemmung und Inaktivierung, auf der anderen Seite aber auch zu ihrer Aktivierung. Beides hat Einfluss auf die Immunabwehr und Entzündungsprozesse sowie auf die Destruktion und Reparatur des parodontalen Gewebes. Im Verlaufe dieses Prozesses können Gingipaine die Gefäßpermeabilität erhöhen und werden deshalb auch als “vaskular permeability enhancement factors” (VPE) bezeichnet (Imamura 2003). Die erhöhte Gefäßpermeabilität geht mit einer gesteigerten Produktion der Sulkusflüssigkeit einher, die durch ihren Proteinreichtum eine wichtige Nahrungsquelle für *P. gingivalis* darstellt.

Gingipaine sind weiterhin in der Lage, Interleukine zu spalten und diese damit zu aktivieren oder hemmen. Die Abspaltung kurzer Fragmente von IL-8 durch lösliche Gingipaine führt zu einer zwei- bis dreifach biologisch wirksameren Form dieses Interleukins, während die Spaltung durch vesikelgebundene Gingipaine die biologische Wirkung von IL-8 aufhebt (Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998).

Neben den proteolytischen Enzymen produziert *P. gingivalis* auch eine Reihe von hydrolytischen Enzymen. Zu den wichtigen Enzymen dieser Wirkungsweise zählen unter anderem die Hyaluronidase, Chondroitinase, Neuraminidase, Phospholipase, sowie eine saure und alkalische Phosphatase (Eley und Cox 2003). Sie weisen verschiedene Wirkungsweisen auf: Während die Hyaluronidase und die Chondroitinase Glykosaminoglykan-Anteile von Proteoglykanen der extrazellulären Matrix hydrolysieren und somit zum Abbau des parodontalen Bindegewebes beitragen, baut die Neuraminidase Sialoproteine des Epithels ab und erhöht so dessen Permeabilität für *P. gingivalis*. Die Phospholipase dagegen führt zur Zerstörung der Oberflächen von Epithel- und anderen Zellen.

Der im Zusammenhang mit *P. gingivalis* beobachtete Abbau des Bindegewebes scheint vor allem von wirtseigenen Enzymen verursacht zu sein, die durch von *P. gingivalis* aktivierten Zellen gebildet werden. Arginin-Gingipaine aktivieren zum Beispiel Fibroblasten und PMNs, die kollagenolytischen Matrix-Metalloproteinasen 1 und 8 (MMP-1, MMP-8) zu produzieren, die dann zum Abbau kollagener Bestandteile des parodontalen Bindegewebes führen (Sorsa et al. 1992).

*Actinobacillus actinomycetemcomitans* ist ein nichtbewegliches, gramnegatives und fakultativ anaerobes Bakterium mit einer Größe von  $0,4 \times 1 \mu\text{m}$ , für welches eine Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ , ein pH-Wert von 7-8 und eine Atmosphäre mit 5 %-igem  $\text{CO}_2$ -Gehalt optimale Wachstumsbedingungen darstellen.

*A. actinomycetemcomitans* kommt in der Mundhöhle von Menschen und Primaten vor (Asikainen et al. 1991, Asikainen und Chen 1999, Beem et al. 1991), wobei er innerhalb der Mundhöhle an verschiedenen Lokalisationen isoliert werden konnte: sowohl in der supragingivalen als auch der subgingivalen Plaque, im Speichel, auf der Wangenschleimhaut, auf der Gingiva, der Zunge, dem harten Gaumen und auf den Tonsillen (Asikainen et al. 1991, Mueller et al. 2001). *A. actinomycetemcomitans* kann sowohl bei parodontal erkrankten als auch bei parodontal gesunden Individuen nachgewiesen werden (Holtta et al. 1994).

*A. actinomycetemcomitans* stellt den Leitkeim der Lokalisierten aggressiven Parodontitis (Slot und Ting 1999) dar. Diese rasch progredient verlaufende Erkrankung betrifft vor allem Patienten im jugendlichen Alter und führt zu einer Destruktion des parodontalen Gewebes im Bereich der Inzisivi und der ersten Molaren.

Auf Grund der Ausbildung von spezifischen Antikörpern wird *A. actinomycetemcomitans* in sechs Serotypen von a-f eingeteilt (Kaplan et al. 2002), wobei herausgefunden wurde, dass die antigenen Eigenschaften auf Kohlenhydratseitenketten von Lipopolysacchariden der Zellwand determiniert sind (Page et al. 1991, Wilson und Schifferle 1991). Bei parodontal erkrankten Individuen wird am häufigsten Serotyp c, bei Gesunden Serotyp b detektiert (Asikainen 1986).

Auf dem Agar bildet *A. actinomycetemcomitans* rundliche, transluzente Kolonien mit einem Durchmesser von ungefähr 2-3 mm, welche entweder eine raue oder eine weiche Oberfläche aufweisen können. Eine typische Eigenschaft der rauen Kolonien ist ihr Er-

scheinungsbild unter dem Mikroskop, das mit dem Bild gekreuzter Zigarren verglichen wird. Aufgrund der Ausbildung von Fimbrien haften rauhe Kolonien fest auf dem Agar an. Nach wiederholten Kultivierungen werden die Kolonien weich und haften nicht mehr auf der Agaroberfläche an. Die Transformation von harten in weiche Kolonien ist mit dem Verlust der Fimbrien verbunden (Inouye et al. 1990).

*A. actinomycetemcomitans* verfügt über eine große Anzahl von Virulenzfaktoren, die über vielfältige Mechanismen zu seiner Pathogenität beitragen. Zu diesen Faktoren zählen Fimbrien, verschiedene Toxine sowie Lipopolysaccharide. Weitere Eigenschaften, die das Ausmaß seiner Pathogenität bestimmen, sind die Fähigkeiten der Adhärenz und Invasion an bzw. in Wirtszellen (Henderson et al. 2003).

Fimbrien ausbildende Stämme von *A. actinomycetemcomitans* haften ebenfalls an festen Oberflächen wie z. B. Glas, Plastik und Hydroxylapatit, der auch mit Speichel überzogen sein kann (Fine et al. 1999a, Fine et al. 1999b, Fine et al. 2001, Harano et al. 1995, Kagermeier und London 1985). Dies ist für die Bildung des Biofilms von Bedeutung. Fimbrien spielen auch eine große Rolle bei der Adhäsion an Epithelzellen.

*A. actinomycetemcomitans* produziert verschiedene Zelltoxine. Einige Stämme von *A. actinomycetemcomitans* bilden ein zell- und artenspezifisches Leukotoxin aus, das zur Familie der RTX-Toxine (repeat in toxin) gehört (Lally et al. 1989). Dieses wird so genannt, weil sich am c-terminalen Ende seiner Proteinstruktur die Aminosäuren wiederholen (Henderson et al. 2003). Über die Bildung von Poren in die Zellmembran tötet es lymphatische und myeloische Zellen von Menschen und Primaten und induziert in Leukozyten die Apoptose (Iwase et al. 1990). Die Arten- und Zellspezifität beruht auf der Bindung des Toxins an den  $\beta 2$ -Integrin-Rezeptor LFA-1 von Wirtszellen (Lally et al. 1999). Ein weiteres von *A. actinomycetemcomitans* gebildetes Toxin ist das sogenannte cytolethal distending toxin (CDT). Dieses stoppt den Zellzyklus im Stadium G2 bei Säugetieren und verhindert so die weitere Zellteilung. Außerdem führt die Spaltung von DNA durch das Toxin zum Absterben von Wirtszellen (Lara-Tejero und Galan 2002, Pickett und Whitehouse 1999).

Lipopolysaccharide (LPS) von *A. actinomycetemcomitans* sind an der Resorption des Alveolarknochens beteiligt. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese bei In-vitro-Versuchen bei langen fetalen Knochen zu einer Calciumfreisetzung führen (Kiley und Holt 1980).

Die genaue Rolle der Lipopolysaccharide ist derzeit noch nicht ganz klar, da sie in Mäusemakrophagen sowohl zur Bildung von IL-1, das zur Knochenresorption beiträgt, als auch zur Bildung des kompetitiven IL-1-Rezeptorantagonisten IL-1ra führen (Nishihara et al. 1989, Nishihara et al. 1994). Neben Lipopolysacchariden sind an der Knochenresorption auch das cytolethale distending toxin, Lipid-A-assoziierte Proteine, Kapselpolysaccharide, Chaperonin 60 und oberflächenassoziiertes Material von *A. actinomycetemcomitans* beteiligt (Reddi et al. 1995, Nishihara et al. 1995, Ueda et al. 1995, Wilson et al. 1985, Kirby et al. 1995).

Lipopolysaccharide verursachen neben der Knochenresorption auch Hautnekrosen, führen zur Plättchenaggregation und zur Aktivierung von Makrophagen (Kiley und Holt 1980).

## **2.5 Interaktionen zwischen parodontopathogenen Bakterien und oralen Epithelzellen**

*P. gingivalis* ist in der Lage, an orale Epithelzellen zu adhären. Das Bakterium konnte auf der Oberfläche von verschiedenen Schleimhautarealen wie z. B. der Zunge, der Wange und der Gingiva lokalisiert werden. Außerdem kann *P. gingivalis* an verschiedene Plaquebakterien, z. B. an orale Streptokokken und *Actinomyces naeslundii*, die zu den frühen Besiedlern der Plaque zählen, aber auch an späte Plaquebesiedler wie *Treponema denticola* und *Fusobakterium nucleatum*, binden. Auch an die Zahnhartsubstanz kann *P. gingivalis* adhären (Lamont und Jenkinson 1998).

Verschiedene Mechanismen vermitteln *P. gingivalis* die Fähigkeit zur Adhärenz, unter anderem sind daran mehrere Arten von Fimbrien, Hämagglutinine und äußere Membranproteine beteiligt (Lamont und Jenkinson 1998). Im Folgenden erfolgt eine nähere Beschreibung dieser Mechanismen.

Die meisten Stämme von *P. gingivalis* bilden Ausstülpungen der Zellwand mit einer Größe von 0,3-3  $\mu\text{m}$  Länge und 5 nm Breite aus, die als Major-Fimbrien bezeichnet werden und sich aus Protein-Untereinheiten (Fimbrillin) mit einer molekularen Größe zwischen 41 und 49 kDa zusammensetzen (Slots und Gibbons 1978, Lee et al. 1991). Major-Fimbrien werden durch das *fimA*-Gen codiert und spielen nicht nur eine große Rolle bei der Adhärenz, sondern auch bei der Internalisierung des Bakteriums in Epithelzellen (Lamont und Jenkinson 1998).

Bei Untersuchungen der DNA konnten auf der Basis von Nukleotid-Sequenzen sechs unterschiedliche Varianten des *fimA*-Gens festgestellt werden, die in die Gruppen I-V und Ib eingeteilt wurden. Plaqueproben von Parodontitispatienten und Gesunden haben folgende Verteilung der *fimA*-Genvariationen gezeigt: bei den Parodontitispatienten wurden vor allem Typ II und IV vorgefunden, während bei Gesunden Typ I am häufigsten angetroffen wurde (Nakagawa et al. 2002).

Die Aminosäuresequenz von Fimbrillin unterscheidet sich stark von den Untereinheiten anderer bakterieller Fimbrien, so dass Major-Fimbrien möglicherweise eine eigene Klasse von Fimbrien bilden (Onoe et al. 1995). Major-Fimbrien vermitteln die Adhärenz an verschiedene orale Substrate und Moleküle, z. B. an prolinreiche Proteine (PRPs), prolinreiche Glykoproteine und Statherine aus der Gruppe der Speichelmoleküle, außerdem an Fibrinogen, Fibronectin und Lactoferrin. Auch die Bindung an frühe Kolonisierer der oralen Plaque wie Streptokokken und *Actinomyces naeslundii* und an orale Epithelzellen erfolgt über Major-Fimbrien (Lamont und Jenkinson 1998). Die über Major-Fimbrien vermittelte Haftung von *P. gingivalis* an orale Epithelzellen erfolgt über eine Ligand-Rezeptor-Bindung, wobei Fimbrillin ein Ligand von  $\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren der eukaryotischen Zellmembran ist (Yilmaz et al. 2002).

Einige Stämme bilden kürzere, sogenannte Minor-Fimbrien aus, deren Protein-Untereinheiten eine Größe von 67 kDa haben. Sie werden durch das *mfa1*-Gen codiert und unterscheiden sich auch in ihren antigenen Eigenschaften von Major-Fimbrien (Umemoto und Hamada 2003). Ihre adhärenenten Eigenschaften sind im Vergleich zu Major-Fimbrien nicht so stark ausgeprägt, aber sie induzieren die Bildung von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  in Mäusemakrophagen (Hamada et al. 2002).

Neben den Hämagglutinin-assoziierten Aktivitäten der *P. gingivalis*-Proteasen bildet das Bakterium acht weitere Hämagglutinine. Diese befähigen ihn unter anderem zur Bindung an Erythrozyten (Lamont und Jenkinson 2000).

Die Fähigkeit der Adhärenz von *P. gingivalis* ist Voraussetzung für die Invasion in Epithelzellen (Yilmaz et al. 2002). Große Bedeutung hat dabei die durch Major-Fimbrien vermittelte Adhärenz. *P. gingivalis* Mutanten ohne Fimbrien zeigen eine wesentlich geringere Invasion im Vergleich zur Adhärenz (Weinberg et al. 1997).

Durch die Bindung der Bakterien an die Epithelzelle wird eine Reihe biochemischer und struktureller Veränderungen induziert, die die bakterielle Penetration ermöglichen. Der Invasion gehen verschiedene Wirtszellprozesse voraus, z. B. kommt es zu intrazellulären Calciumionenströmen, Protein-Phosphorylierungen und der Synthese von Proteinen. In der Folge wird das zelluläre Zytoskelett verändert und es kommt zu Membraninvaginationen, die den Bakterien Eintritt in die Zelle ermöglichen (Lamont et al. 1995). Außerdem scheint die Ausbildung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten Voraussetzung für die Invasion von Bakterien zu sein (Lamont et al. 1995). Der Vorgang der bakteriellen Invasion ist nach 12 min abgeschlossen (Belton et al. 1999).

Innerhalb der Zelle hält sich *P. gingivalis* wahrscheinlich nicht in membrangebundenen Vakuolen auf (Lamont und Jenkinson 1998), obwohl zytoplasmatische Vakuolen in KB-Zellen nach der Invasion von *P. gingivalis* beobachtet wurden (Njoroge et al. 1997). Eine Ansammlung von *P. gingivalis* wurde in der perinukleären Region beobachtet (Belton et al. 1999).

Die Bakterien bleiben innerhalb der Zellen über 24 h vital und behalten sogar ihre Fähigkeit der Replikation (Belton et al. 1999, Madianos et al. 1996). Die infizierten Epithelzellen erhalten ihre physiologische Integrität, wobei jedoch Veränderungen von Form und Morphologie auftreten. Während nicht infizierte Zellen eine rhomboide Form aufweisen, ist die der erkrankten Zellen kugelig und kontrahiert. Diese Veränderungen werden auf den Umbau des Zytoskeletts zurückgeführt, wobei es zu einer Kondensation und zum Verlust von Aktinfilamenten kommt (Belton et al. 1999).

Die Invasion ist ein wichtiger Virulenzfaktor, weil sie dem Bakterium Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes bietet und zur Zerstörung des Gewebes beiträgt (Lamont et al. 1995). Außerdem ermöglicht es dem Bakterium die Replikation in einer nahrungsreichen Umgebung (Lamont et al. 1995). Innerhalb von Zellen sind Bakterien nicht für Antikörper, Phagozyten oder Antibiotika zugänglich und somit vor allem in ihrer Proliferationsphase geschützt (Sandros et al. 1994). Somit trägt die Invasivität von *P. gingivalis* möglicherweise zur Progression von chronischen Verläufen parodontaler Erkrankungen bei (Rudney et al. 2001).

An verschiedenen Zelltypen wurden bereits Invasionsvorgänge mit *P. gingivalis* untersucht, wobei Studien an primären Zellkulturen von gingivalen Epithelzellen (Lamont et al. 1995, Lamont et al. 1992), oralen Epithelzelllinien (Duncan et al. 1993, Njoroge et al. 1997, Sandros et al. 1996) und mehrschichtigen Taschenepithelzellen (Sandros et al. 1994) durchgeführt wurden. Dabei wurde herausgefunden, dass die Invasion in primären Zellkulturen effizienter als in transformierten Zellkulturen ist. Möglicherweise führt die Transformation zu einer Veränderung von Oberflächenrezeptoren oder intrazellulären Signalwegen, die für den Invasionsprozess von Bedeutung sind (Duncan et al. 1993, Lamont et al. 1995).

Der Kontakt von *P. gingivalis* mit Epithelzellen induziert bei *P. gingivalis* die Produktion von verschiedenen, wahrscheinlich speziellen Proteinen mit einer Größe zwischen 35 und 95 kDa, die direkt in das Zytoplasma der Epithelzellen sezerniert werden. Dieser Vorgang wird als kontakt-abhängige Proteinfreisetzung beschrieben und auch Typ-3-Sezernierung genannt (Park und Lamont 1998). Gleichzeitig wird die Produktion von Gingipainen vermindert (Park und Lamont 1998).

Die Infektion von oralen Epithelzellen mit *P. gingivalis* führt zu einer transienten Erhöhung der zytosolischen Calciumionenkonzentration (Izutsu et al. 1996). Dies erfolgt durch die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Kompartimenten, nicht durch einen extrazellulären Calciumioneneinstrom. Calciumionenströme spielen eine große Rolle bei vielen Signalwegen und ändern möglicherweise die Konfiguration calciumabhängiger Ionenkanäle der Zytoplasmamembran oder die Konfiguration des Zytoskeletts (Izutsu et al. 1996).

Weiterhin führt die Infektion der oralen Epithelzellen mit *P. gingivalis* zu einer Phosphorylierung des fokalen Adhäsionsproteins Paxillin (Yilmaz et al. 2002). Paxillin ist an der Signaltransduktion von Integrinen beteiligt. In vielen Zelltypen folgt der Paxillinphosphorylierung eine Aktivierung anderer Signalmoleküle, die die Zusammensetzung von Adhäsionskomplexen steuern. Die Bildung dieser Multikomponentkomplexe generiert Kräfte, die Einfluss auf die Dynamik des Zytoskeletts haben und so intrazelluläre Signale an spezifische Ziele in der Zelle leiten (Yilmaz et al. 2003).

Die Proteasen von *P. gingivalis* denaturieren IL-8, wenn *P. gingivalis* in hohen Konzentrationen vorhanden ist. Außerdem kann *P. gingivalis* bei gingivalen Epithelzellen eine Hemmung der IL-8 Synthese hervorrufen (Darveau et al. 1998). IL-8 ist ein stark chemotaktisch

wirkendes, proinflammatorisches Protein, dass seine Wirkung auf PMNs entfaltet und diese an den Ort der bakteriellen Belagerung führt. Indem *P. gingivalis* die Produktion dieses Interleukins unterbindet oder es abbaut, beeinflusst er die sensorische Funktion der Epithelzellen. Diese sind in der Folge nicht mehr in der Lage, die Information der Infektion auf diesem Weg an das Immunsystem zu senden (Darveau et al. 1998).

*P. gingivalis* kann auch über einen parazellulären Weg die Epithelbarriere durchbrechen und in das Innere des parodontalen Gewebes gelangen. Gingipaine, von denen in dieser Hinsicht KGP von besonderer Bedeutung sind, können interepitheliale Haftproteine (E-Cadherine) denaturieren und somit einen Zutritt für *P. gingivalis* ins Gewebe schaffen (Katz et al. 2000, Katz et al. 2002).

*A. actinomycetemcomitans* ist nicht nur in der Lage, an Wirtszellen zu adhären, sondern er kann auch verschiedene Zelltypen penetrieren. Bei der Invasion handelt es sich um einen aktiven, komplexen Vorgang, der von *A. actinomycetemcomitans* induziert wird (Meyer et al. 1996, Sreenivasan et al. 1993a). Dabei werden nacheinander folgende Schritte durchlaufen: Adhäsion an die Wirtszelle, Bindung an einen Rezeptor, Eintreten in eine membranumgebene Vakuole, Replikation, intrazelluläre Verteilung, Austreten aus der Wirtszelle und Wandern von Zelle zu Zelle (Meyer et al. 1996).

Der Weg in die Zelle hinein führt über die Bindung an Rezeptoren der Wirtszelle. Es sind zwei Rezeptoren bekannt, an die *A. actinomycetemcomitans* im Invasionsprozess binden kann. Dabei handelt es sich um einen Transferrin-Rezeptor (Meyer et al. 1997) und den platelet-aktivating-faktor-receptor (PAF-Rezeptor) (Schenkein et al. 2000). Außerdem kann *A. actinomycetemcomitans* an epitheliale Zellintegrine binden, um in die Zelle zu gelangen (Meyer et al. 1997, Saarela et al. 1999).

Stämme, die weiche Kolonien ausbilden, sind invasiver als rauhe Kolonien ausbildende Stämme (Lepine et al. 1998). Das weist darauf hin, dass Fimbrien, die von rauhen Kolonien gebildet werden, zwar an der Adhärenz, nicht aber an der Zellinvasion beteiligt sind (Meyer und Fives-Taylor 1994).

Für die Invasion in Wirtszellen nutzt *A. actinomycetemcomitans* den Aktinanteil des Zytoskeletts (Brisette 1997). Über bisher unbekannte Zellsignale wird in den Wirtszellen Aktin aus der Zellmitte zur Zellperipherie in die Nähe des Bakteriums transportiert (Fives-Taylor



et al. 1995, Lippmann et al. 1996). Dies führt zur Auslöschung der Mikrovilli und zur Bildung von Kratern auf der Zelloberfläche, über die *A. actinomycetemcomitans* in die Zelle gelangt (Meyer et al. 1996, Sreenivasan et al. 1993a). Das Bakterium wird zunächst in eine membranumhüllte Vakuole eingeschlossen (Meyer et al. 1997). Einmal internalisiert, verlässt *A. actinomycetemcomitans* das Endosom und gelangt ins Zytoplasma (Sreenivasan et al. 1993a, Blix et al. 1992, Meyer et al. 1996, Meyer et al. 1991). Innerhalb der Zelle kann sich *A. actinomycetemcomitans* innerhalb von 20 min replizieren (Fives-Taylor et al. 1999). Dies entspricht einem Siebentel der auf dem Agar gemessenen Replikationszeit (Sreenivasan et al. 1993b).

*A. actinomycetemcomitans* kann über Mikrovilli von einer Zelle in die nächste gelangen (Meyer et al. 1996, Meyer et al. 1997, Meyer et al. 1999, Sreenivasan et al. 1993b) und somit tief in das Epithel eindringen. Epithelzellen, in die *A. actinomycetemcomitans* eingedrungen ist, sterben durch Apoptose ab (Kato et al. 2000).

*A. actinomycetemcomitans* induziert sowohl in gingivalen Fibroblasten als auch in Epithelzellen die Produktion von IL-6 und -8, aber nicht die Bildung von IL-1 $\beta$  (Dongari-Bagtzoglou und Ebersole 1996, Uchida et al. 2001). Humane mononukleäre Zellen werden durch *A. actinomycetemcomitans* zur Bildung der Chemokine MIP-1 $\alpha$  (Monozytenchemotaktisches Protein 1 $\alpha$ ) und RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secretion) angeregt.

## **2.6 Therapie der parodontalen Erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung des Metronidazols**

Das heutige Konzept zur Behandlung parodontaler Erkrankungen umfasst eine mehrphasige, sogenannte systematische Parodontaltherapie (Erpenstein und Diedrich 2004). Vor Behandlungsbeginn erfolgt die Befunderhebung des parodontalen Status über Sondierung der Taschentiefen, Feststellen von Plaque- sowie Blutungsindizes, Röntgendiagnostik und gegebenenfalls einer mikrobiologischen Diagnostik.

Die Therapie beginnt mit der Hygienephase, deren Ziel die Beseitigung der Entzündung ist. Im Vordergrund steht dabei die Entfernung sowohl harter als auch weicher Zahnbeläge und die Glättung der supra- und vor allem subgingivalen Zahnoberfläche. Einige Autoren

propagieren, dass die Effizienz der Keimeliminierung steigt, wenn das Konzept der sogenannten full-mouth-disinfection angewendet wird (Quirynen et al. 1995). Dabei erfolgt die Behandlung aller vier Quadranten innerhalb von 24 Stunden unter Verwendung von antimikrobiellen Substanzen, z. B. Chlorhexidinspülungen. Eine adjuvante Antibiotikatherapie erfolgt nur nach Erstellung einer mikrobiologischen Diagnostik und dem Nachweis von parodontopathogenen Bakterien, wie z. B. *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis*.

Ein wichtiger Aspekt für den langfristigen Erfolg der Behandlung ist die Anleitung und Motivation des Patienten zur Verbesserung der eigenen Zahnpflege. Weiterführende Behandlungen prothetischer oder konservierender Art dienen dem Ziel, einen hygienefähigen Gebisszustand zu schaffen. Nach Abschluss der Hygienephase werden die parodontalen Befunde reevaluiert. Wenn die Reevaluation optimale hygienefähige Verhältnisse ergibt, sind keine chirurgischen Eingriffe notwendig und der Patient kann in die Erhaltungstherapie übernommen werden (Erpenstein und Diedrich 2004).

Nach der Hygienephase bestehende Taschentiefen über 5 mm, fehlende keratinisierte Gingiva sowie unphysiologische Knochen- oder Weichteilkonturen behindern die Hygienefähigkeit und stellen eine Indikation zur chirurgischen Intervention dar. In der sich an die Hygienephase anschließenden korrektiven Phase erfolgt eine Verbesserung der Hart- und Weichgewebkonturen z.B. durch Osteo- oder Gingivoplastiken. Ziel dieser Maßnahmen ist die Schaffung eines hygienefähigen Gebisszustandes (Erpenstein und Diedrich 2004).

Während es lange Zeit nicht möglich war, den durch die Entzündung resorbierten Knochen wieder aufzubauen und somit neues Attachment zu erreichen, konnten in den letzten Jahren mit zwei Verfahren Erfolge im Bereich der Regenerativen Therapie erzielt werden. Einerseits induziert die Anwendung von Schmelzmatrixproteinen in vertikalen Knochentaschen den Wiederaufbau von Knochen- und Faserstrukturen und führt somit zum Gewinn neuen Attachments (Heden et al. 1999). Andererseits wird dies auch bei der Verwendung von Membranen erreicht, die während des operativen Eingriffs über einem Knochendefekt befestigt werden (Becker und Becker 1993). Dabei verhindern die Membranen eine epitheliale Auskleidung der parodontalen Tasche und führen somit über den physiologischen Knochenbildungsvorgang zu einer Reduktion der Taschentiefe.

Ziel der Erhaltungstherapie ist es, einer erneuten Entzündung des Parodonts vorzubeugen.

Dies kann einerseits durch regelmäßige professionelle Reinigung der Zähne und andererseits durch die Remotivation der Patienten erreicht werden. Da Patienten, die bereits parodontale Entzündungen hatten, ein höheres Risiko einer erneuten Erkrankung haben als bisher gesunde Patienten, sollte die Erhaltungstherapie lebenslang durchgeführt werden (Erpenstein und Diedrich 2004).

Mit der Entwicklung der speziellen Plaquehypothese, also der Vorstellung, dass einige parodontale Erkrankungsbilder von wenigen, speziellen Bakterien verursacht werden, begann einerseits die Untersuchung dieser Bakterienspezies und andererseits die Suche nach wirksamen antibakteriellen Medikamenten, die additiv zur mechanischen Therapie Verwendung finden sollten, um die Bakterien in der Tiefe der Tasche eliminieren zu können. Die Bekämpfung von akuten nekrotisierenden Gingivitiden und Parodontitiden, deren Verursacher Spirochäten darstellen, wurde bereits seit Anfang der 60-er Jahre mit Metronidazol durchgeführt (Shinn 1962). Die Wirksamkeit von Metronidazol gegenüber anderen parodontalen Erkrankungen wurde 1979 in einer ersten Studie an Hunden getestet (Heijl und Lindhe 1979), viele weitere klinische Studien folgten dann an parodontal erkrankten Menschen, wobei verschiedene Therapievarianten mit zusätzlicher Metronidazolgabe genauso getestet wurden wie die vergleichende Wirksamkeit von Metronidazol gegenüber anderen Antibiotika (Loesche et al. 1981, Saxen und Asikainen 1993). Es wurde ebenso eine große Anzahl von In-vitro-Studien bezüglich der Wirksamkeit von Metronidazol gegenüber parodontitisrelevanten Bakterien durchgeführt (Pavicic et al. 1992, Eick et al. 2002).

In der Zahnheilkunde wird Metronidazol in Form eines flüssigen Gels, Elyzol-Gel, als lokales Therapeutikum gegen anaerobe parodontopathogene Bakterien verwendet. Seine Indikation besteht auch in der Behandlung von akuten nekrotisierenden Gingivitiden und Parodontitiden. Im sogenannten Winkelhoff-Cocktail werden Amoxicillin in Kombination mit Metronidazol systemisch verabreicht, um *Actinobacillus actinomycetemcomitans* assoziierte Parodontitiden zu therapieren (van Winkelhoff et al. 1992).

Einige Autoren propagieren die lokale Verwendung von Metronidazol in der Parodontistherapie und sehen darin den Vorteil, dass sich das Antibiotikum in hohen Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit ansammeln und antibakteriell wirken kann, ohne jedoch mit den Nachteilen, die bei systemischer Applikation auftreten, vergesellschaftet zu sein (Addy et al. 1982, Kinane und Radvar 1999).

Metronidazol ist ein Antibiotikum aus der Wirkstoffgruppe der Nitroimidazol-Derivate. Der antibakterielle Wirkstoff entsteht erst durch die reduktive Verstoffwechselung der Nitro-Gruppe durch Nitroreduktasen der Mikroorganismen. Die dabei gebildeten Nitroderivate reagieren mit den Basen der mikrobiellen DNA, führen zu deren Schädigung und in der Folge zum Absterben der Bakterien (Leiros et al. 2004).

Neben der Anwendung zur Bekämpfung parodontaler Infektionen wird Metronidazol auch zur Behandlung von vaginalen Infektionen mit *Trichomonas vaginalis*, sowie auch gegen Infektionen mit *Entamoeba histolytica*, *Enterococcus* Spezies, *Gardia lamblia*, Clostridien und Anaerobiern verwendet. Der Wirkstoff findet ebenfalls Verwendung in der Bekämpfung von Magenschleimhautentzündungen durch *Helicobacter pylori*, wobei weitere Medikamente in einer Tripeltherapie kombiniert werden (Leiros et al. 2004).

### 3 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Wechselwirkungen, die zwischen Metronidazol, einem in der Parodontitistherapie etablierten Antibiotikum, parodontopathogenen Bakterien und Epithelzellen auftreten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte einerseits die Wirkung des Metronidazols auf die Bakterien *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 untersucht werden. Ein anderer Aspekt unserer Arbeit widmete sich der Fragestellung, inwieweit die Freisetzung von Zytokinen aus Epithelzellen durch Metronidazol und parodontopathogene Bakterien moduliert wird. Die Untersuchungen waren dabei an KB-Zellen, einer permanenten Epithelzelllinie, durchzuführen.

Verschiedene klinisch relevante Metronidazolkonzentrationen sollten im Hinblick auf die bisher nicht abgeschlossene Kontroverse, inwieweit die lokale Applikation des Medikamentes gegenüber der systemischen Applikation von Vorteil ist, in Bezug auf Wirkungsunterschiede untersucht werden. Zusätzlich zur dafür ausgewählten Serum- und Sulkuskonzentration (10 bzw. 100 µg/ml) sollte eine subinhibitorische Konzentration des Metronidazols (1/4 MHK) untersucht werden, um mögliche Effekte des Medikaments auf die KB-Zellen mit Einfluss auf die Bakterienzahl festzustellen.

Da es sich sowohl bei *A. actinomycetemcomitans* als auch bei *P. gingivalis* um Bakterien mit den Fähigkeiten der Adhärenz und Invasion an bzw. in Epithelzellen handelt, sollte die Wirksamkeit des Metronidazols auf freie, adhärente und invasive Bakterien untersucht werden, um mögliche Unterschiede in der Keimreduktion zu evaluieren. Die gezielte Untersuchung der invasiven Bakterien ist motiviert durch die Tatsache, dass der Vorgang der Invasion die Bakterien sowohl vor dem Immunsystem des Wirtes als auch vor vielen antibakteriell wirksamen Medikamenten schützt und somit zur Chronifizierung der parodontalen Erkrankung beiträgt. Die Fähigkeit der Adhärenz ist in diesem Zusammenhang ebenfalls von Bedeutung, da sie bei *P. gingivalis* einen Zwischenschritt im Invasionsprozess darstellt.

Aufgrund der Tatsache, dass Zytokine als zelluläre Botenstoffe unter anderem bei Entzündungsvorgängen von Bedeutung sind, spielt ihre Interaktion eine wichtige Rolle bei den parodontalen Erkrankungen. Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand auch darin herauszufinden, welche Einflüsse das Metronidazol und die zu untersuchenden Bakterien

auf die Freisetzung von Zytokinen aus KB-Zellen ausüben. Hierbei sollte die Freisetzung des auf Granulozyten chemotaktisch wirkenden IL-8, die beim Abbau des Bindegewebes wichtigen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1, das bei der unspezifischen Reihung der B-Zellen wichtige IL-6 sowie TGF- $\beta_1$ , das eine zentrale Rolle bei der Regeneration von Geweben spielt, untersucht werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte auch geklärt werden, ob sich additive oder auslöschende Effekte bei der Interaktion zwischen Metronidazol und den Bakterien in Bezug auf die Induktion der Zytokinfreisetzung feststellen lassen.

Um die Effekte genauer zu bestimmen, sollten neben der Zugabe des Metronidazols zu den Zellen zum Zeitpunkt der Infektion auch die Bakterien bzw. die Zellen mit dem Medikament vorinkubiert werden. Für die genauere Einschätzung der Kinetik der Zytokinfreisetzung sollte die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 6 h und 18 h) nach der Infektion der Zellen erfolgen.

Insgesamt sollte diese Arbeit dazu beitragen, das Wissen über das in der Parodontitistherapie verwendete Metronidazol zu erweitern und seine keimeliminierende Wirkung genauer zu untersuchen. Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob im Kontakt mit den KB-Zellen ein immunmodulatorischer Effekt des Medikaments evaluiert werden kann.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Bakterienstämme und minimale Hemmkonzentration des Metronidazols

Die Wirkung des Metronidazols wurde an den Bakterienstämmen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 und *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 getestet. Während *A. actinomycetemcomitans* Y4 einen leukotoxinbildenden Stamm darstellt, handelt es sich bei *P. gingivalis* ATCC 33277 um einen Referenzstamm. Beide Stämme wurden aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig, Deutschland, bezogen.

Zunächst wurde für jeden dieser Bakterienstämme die minimale Hemmkonzentration (MHK) für Metronidazol ermittelt. Die MHK ist die kleinste Konzentration eines Antibiotikums, die das Wachstum einer Bakterienspezies hemmt. Die Bestimmung der MHK erfolgte mit E-Test-Streifen der Fa. Viva Diagnostika (Soelna, Schweden). Die Bakterien wurden mit einem sterilen Wattestäbchen auf eine Agarplatte mit Schaedler-Agar (Fa. Oxoid Wesel, Deutschland), der 8 % Schafsblut enthält, aufgetragen und anschließend wurde ein Teststreifen, der Metronidazol in aufsteigenden Konzentrationen enthielt, auf die Platte gelegt. Die so vorbereiteten Agar-Platten wurden bei einer Temperatur von 37° C inkubiert, dabei wurde *A. actinomycetemcomitans* in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet, während *P. gingivalis* unter anaeroben Bedingungen angezüchtet wurde. Nach zwei Tagen konnte die Konzentration des Metronidazols abgelesen werden, bei der eine Hemmhofbildung aufgetreten war. Bei *A. actinomycetemcomitans* betrug die MHK >256 µg/ml, der Keim wies somit eine Resistenz gegenüber Metronidazol auf. Die MHK von *P. gingivalis* für Metronidazol betrug 0,125 µg/ml.

Für jeden Versuch wurden zwei Agarplatten mit dem entsprechenden Bakterienstamm überimpft und für 18 h inkubiert.

### 4.2 KB-Zellen

Alle Versuche wurden an einer permanenten Zelllinie (KB-Zellen), die einem humanen oralen Epidermoidkarzinom entstammt, durchgeführt.

Die Anzüchtung dieser Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen der Fa. Greiner (Frickenhau- sen, Deutschland) unter Verwendung von eagle minimum essential medium (EMEM, Fa. Bio Whittacker, Verviers, Belgien), dem 10 % fetales Kälberserum (FCS, Fa. Gibco BRL, Pais- ley, Großbritannien) hinzugefügt worden war. Dabei bildeten die Zellen auf dem Boden der Zellkulturflaschen einen einschichtigen Zellrasen.

Die Zellen einer dichtbewachsenen Zellkulturflasche wurden auf eine 24-Well-Platte pas- sagiert. Dazu wurde zunächst das alte Zellkulturmedium abgesaugt und anschließend wurden die Zellen mit einer phosphatgepufferten NaCl-Lösung (PBS) gewaschen. Nach einer 10- minütigen Einwirkzeit von 1 ml EDTA-Trypsin (5 %-ig) löste sich der Zellrasen vom Boden der Zellkulturflasche ab. Die gelösten Zellen wurden mit neuem Zellkulturmedium, das FCS enthielt, durchmischt und auf die 24-Well-Platten pipettiert. Anschließend wurden die Plat- ten für 18 h in einen Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> (Fa. Haereus, Hanau, Deutschland) gestellt. Vor der weiteren Verwendung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die KB-Zellen einen dichten Zellrasen gebildet hatten.

Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden.

### **4.3 Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol**

Ziel dieses Versuchsaufbaus war es herauszufinden, welchen Einfluss die Vorbehandlung der KB-Zellen mit Metronidazol auf die Anzahl der Bakterien hat. Wir wollten untersuchen, ob die Vorbehandlung der Zellen mit Metronidazol zu einer Veränderung der Zahl der ad- härenten, invasiven oder freien Bakterien führt. Außerdem interessierte uns die Frage, ob Metronidazol oder die Bakterien Einfluss auf die Zytokinbildung der KB-Zellen haben.

#### **Vorbereitung der Zellen**

Für die Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol wurde das Zellkulturmedium (EMEM) ohne FCS mit Metronidazol (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) in drei verschiedenen Konzentrationen angesetzt. Zusätzlich wurde ein Kontroll-Medium ohne Metronidazol ver- wendet.



Für alle Versuche wurden folgende Metronidazol-Konzentrationen verwendet:

1. Medium ohne Metronidazol (Kontrolle)
2. Metronidazol in einer Konzentration von 1/4 MHK bei *P. gingivalis* bzw. 1/4 der Serumkonzentration bei *A. actinomycetemcomitans* wegen der festgestellten Resistenz gegenüber Metronidazol (1/4 MHK)
3. Metronidazol in einer Konzentration von 10 µg/ml, entsprechend der Serumkonzentration bei systemischer Applikation (Serumkonzentration) (van Oosten et al. 1986)
4. Metronidazol in einer Konzentration von 100 µg/ml entsprechend der Konzentration in der Sulkusflüssigkeit bei lokaler Applikation (Sulkuskonzentration) (Stoltze 1992)

Die Zellen wurden dem Inkubator entnommen und mit PBS gewaschen. Die oben beschriebenen Medien wurden nun der Reihe nach in die Wells der Zellkulturplatte pipettiert: in die erste Reihe Medium ohne Metronidazol (Kontrolle), in die zweite Reihe Medium mit 1/4 MHK, in die dritte Reihe Medium mit 10 µg/ml Metronidazol und in die vierte Reihe Medium mit 100 µg/ml Metronidazol (siehe Abbildung 1). Die Zellen wurden anschließend für 1 h in den Inkubator gestellt, um das Metronidazol auf die Zellen einwirken zu lassen. Danach wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen.

### **Infektion der Zellen**

Für die Infektion der Zellen wurden die Bakterien mit einem sterilen Wattestäbchen von den Agarplatten entnommen und in Medium 199 (Fa. Gibco BRL, Paisley, Großbritannien) eingerührt. Diese Suspension wurde mittels Photometer auf eine optische Dichte von  $OD_{640nm} = 0,1$  eingestellt (entsprechend ca.  $10^8$  Bakterien pro ml Flüssigkeit). Im Anschluss daran wurde die Bakteriensuspension im Verhältnis von 1 zu 9 zum Zellkulturmedium EMEM (ohne FCS) hinzugegeben. Zur Kontrolle wurde Medium mit PBS verwendet, das im gleichen Verhältnis zugefügt worden war.

Nach dem Waschen der Zellen wurden nun die Zellkulturmedien mit und ohne Bakterien auf die Zellen gegeben. Dabei wurde in die erste und zweite Spalte pro Well je 1 ml Medium

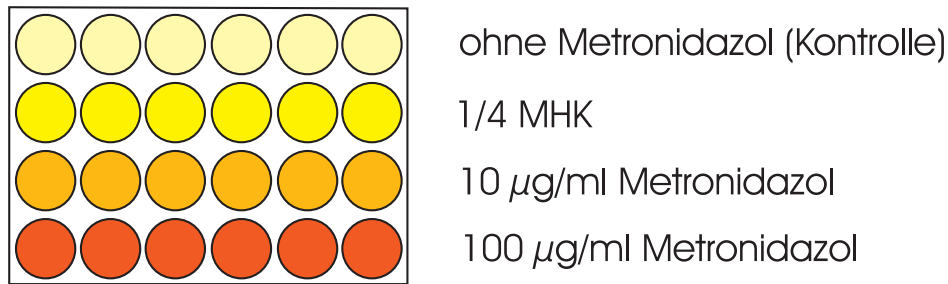


Abbildung 1: Verteilung der Metronidazol-Lösungen auf die KB-Zellen

mit PBS, in die dritte bis sechste Spalte je 1 ml des Zellkulturmediums mit den Bakterien pipettiert (siehe Abbildung 2). Die Platten wurden nun für 1 h, 6 h und 18 h in den Brutschrank gestellt.

#### **Entnahme der Proben für die Zytokinauswertung und Bestimmung der Zahl der lebenden Bakterien nach 1 h, 6 h und 18 h**

Die Weiterbearbeitung der Platten erfolgte jeweils nach 1 h, 6 h und 18 h. Von jedem Well wurden 0,8 ml Flüssigkeit entnommen und in ein steriles Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Proben wurden für 10 min bei 14 000 Umdrehungen pro Minute in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand zunächst bei -20° C tiefgefroren. Sie dienen der späteren Bestimmung der Zytokinkonzentrationen.

Nach 6 und 18 h wurden die nicht adhärenenten (sich frei in der Lösung befindenden) Bakterien angezüchtet. Dazu wurden aus dem dritten und vierten Well einer Reihe jeweils 5 µl Flüssigkeit entnommen und zusammen in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Bakterienlösung wurde mit 990 µl PBS verdünnt und auf dem Vortex-Rüttler gemischt. Je Zentrifugenröhrchen wurden 100 µl Flüssigkeit auf einer Agarplatte ausgespatelt. Auf diese Weise wurden auch die freien Bakterien aus dem fünften und sechsten Well jeder Reihe gewonnen.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten (1 h, 6 h und 18 h) wurde die Anzahl der adhärenenten Bakterien auf folgende Weise bestimmt: Nach dreifachem Waschen der Zellen zum Entfernen der nicht adhärenenten Bakterien wurde in jeden Well der dritten und fünften Spalte 1 ml Ampuwa (Aqua dest., Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) pipettiert, um die Zellen zu lysieren und anschließend die adhärenenten Bakterien anzüchten zu können. Nach einer 15-minütigen Einwirkzeit wurden aus der dritten und fünften Spalte jeder Reihe nach

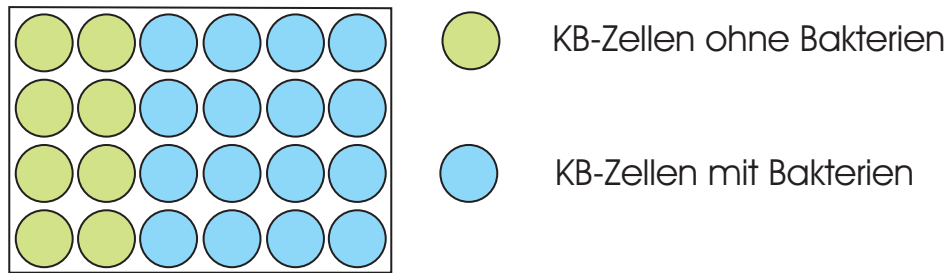


Abbildung 2: Verteilung der Bakteriensuspension und des Kontrollmediums auf den Zellen

dem Durchmischen je 10  $\mu$ l Flüssigkeit pro Well entnommen und auf einer Agarplatte ausgespatelt.

In der vierten und sechsten Spalte wurden die adhärenenten Bakterien mittels einer Antibiotikallösung abgetötet, um die intrazellulären Bakterien anzüchten und ihre Zahl ermittelt zu können. Für *P. gingivalis* wurde dafür Zellkulturmedium EMEM (ohne FCS) mit Metronidazol in einer Konzentration von 50 mg/ml verwendet. Wegen der Resistenz von *A. actinomycetemcomitans* gegenüber Metronidazol wurde hier Gentamicin (Fa. Ratiopharm, Ulm, Deutschland) in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml angewendet. In jeden Well wurde 1 ml der entsprechend vorbereiteten Antibiotikallösung pipettiert. Die Antibiotikallösung wirkte 1 h auf die Bakterien ein. Diese Methode wurde am Institut für medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität eingeführt. Voruntersuchungen zeigten eine gute abtötende Wirkung auf adhärenente und nicht invasive Bakterien.

Anschließend wurde die Wirkung der Antibiotikallösung auf die nicht invasiven Bakterien überprüft. Hierzu wurden Proben mit einer sterilen Öse entnommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nachfolgend wurde in jeden Well für 10 min 1 ml Ampuwa pipettiert, um die Zellen zu lysieren. Von jedem Well wurden 100  $\mu$ l Flüssigkeit auf eine Agarplatte für die Anzucht der invasiven Bakterien ausgespatelt.

Die Agarplatten wurden für 7-10 Tage entsprechend den optimalen Wachstumsbedingungen der Bakterien bebrütet. Dabei wurde *A. actinomycetemcomitans* bei 37° C und einem 5 %-igem CO<sub>2</sub>-Gehalt in der Atmosphäre inkubiert, während *P. gingivalis* unter anaeroben Bedingungen bei 37° C angezüchtet wurde. Abschließend konnten die Kolonie bildenden Einheiten der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien bestimmt werden.

#### 4.4 Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol

Bei diesem Versuchsaufbau wollten wir herausfinden, ob die Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol Einfluss auf die Fähigkeit der Bakterien hat, an KB-Zellen zu adhären bzw. sie zu penetrieren. Von Interesse war bei diesem Versuch auch, ob die Vorinkubation der Bakterien Einfluss darauf nimmt, inwieweit die Bakterien die Zytokinfreisetzung aus KB-Zellen beeinflussen.

Mit einem sterilen Wattestäbchen wurden im ersten Schritt die Bakterien von den Agarplatten entnommen und dann in PBS eingerührt. Um eine homogene Suspension zu erhalten, wurde die Lösung auf dem Vortexrüttler gemischt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf vier Tubes zu je 2 ml verteilt und es erfolgte die Zugabe des Metronidazols in den Konzentrationen 1/4 MHK, 10  $\mu\text{g/ml}$  und 100  $\mu\text{g/ml}$ . Als Referenz wurde in das vierte Röhrchen kein Metronidazol zu den Bakterien gegeben. Das Metronidazol wirkte 1 h auf die Bakterien ein.

Im Anschluss daran wurden die Tubes mit der Bakterien-Metronidazol-Suspension für 10 min bei 14 000 Umdrehungen pro Minute in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Dabei setzten sich die Bakterien auf dem Boden der Tubes ab, so dass der metronidazolhaltige Überstand entnommen werden konnte. Die Bakterien wurden mit PBS gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum entfernt.

Die so vorbereiteten Bakterien wurden nun in Medium 199 suspendiert und am Photometer auf eine optische Dichte von  $\text{OD}_{640\text{nm}} = 0,1$  eingestellt. Im nächsten Schritt wurde die Bakteriensuspensionen jeweils im Verhältnis 1 zu 9 zum Zellkulturmedium EMEM dazugegeben. Zur Kontrolle wurde Zellkulturmedium ohne Bakteriensuspension verwendet. Die Vorbereitungen wurden mit dem Waschen der Zellen abgeschlossen.

Nach Fertigstellung der Bakteriensuspensionen und des Kontrollmediums wurden diese für einen Zeitraum von 1 h, 6 h und 18 h auf die Zellen aufgebracht. Dies erfolgte nach dem in Abbildung 2 dargestellten Pipettierschema.

Die Entnahme der Proben für die Zytokinbestimmung sowie die Bestimmung der Zahl der lebenden Bakterien nach 1 h, 6 h und 18 h erfolgte wie zuvor beschrieben.

## 4.5 Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion

Bei diesem dritten Versuchsablauf gingen wir der Fragestellung nach, welche Auswirkung die initiierte Infektion der KB-Zellen mit den parodontopathogenen Bakterien und die gleichzeitige Zugabe des Metronidazols hinsichtlich der Zahl der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien sowie der Zytokinbildung der Zellen hat.

Für diese Versuchsreihe wurden zunächst den Zellkulturmedien Metronidazol in den jeweiligen Endkonzentrationen (1/4 MHK, 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ ) beigelegt und anschließend entweder mit PBS (Kontrolle) oder mit Bakteriensuspension im Verhältnis 1 zu 9 versehen.

Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurden die so vorbereiteten Suspensionen auf die 24-Well-Kulturplatten aufgebracht: in die erste und zweite Spalte wurden die Medien ohne Bakterien pipettiert, wobei die Metronidazolkonzentration von der ersten bis zur vierten Reihe zunahm, in die dritte bis sechste Spalte wurden die Bakteriensuspensionen pipettiert, ebenfalls mit ansteigender Metronidazolkonzentration von der ersten bis zur vierten Reihe. Die Zellen wurden für 1 h, 6 h und 18 h in den Brutschrank gestellt und dann, wie zuvor beschrieben, weiterbearbeitet.

## 4.6 Nachweis der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta_1$ und TNF $\alpha$

ELISA-Tests der Fa. Biosource (Solingen, Deutschland) wurden zur Bestimmung der Konzentration der Interleukine (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, sowie des Transforming Growth Faktor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) und des Tumornekrosefaktors (TNF $\alpha$ ) angewendet. Dabei wurden die Interleukine im Sandwichverfahren nachgewiesen.

Für die ELISA-Tests wurden 96-er Mikrotiterplatten verwendet. Zunächst wurden die Mikrotiterplatten mit dem sogenannten Capture-Antikörper versehen. Dazu wurde die nach Anleitung des Herstellers vorgesehene Menge Antikörper (AK) (je nach zu detektierendem IL 4-10  $\mu\text{l}$ ) in 10 ml PBS gelöst und davon wurden je 100  $\mu\text{l}$  in jeden Well pipettiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgeklebt und für 18 h in einen Kühlschrank gestellt, damit der Capture-AK eine Bindung mit der Wand der Wells eingehen konnte. Die Capture-Antikörper-Lösung wurde nach Ablauf der vorgeschriebenen Einwirkzeit durch Abklopfen der Mikrotiterplatten aus den Wells entfernt.

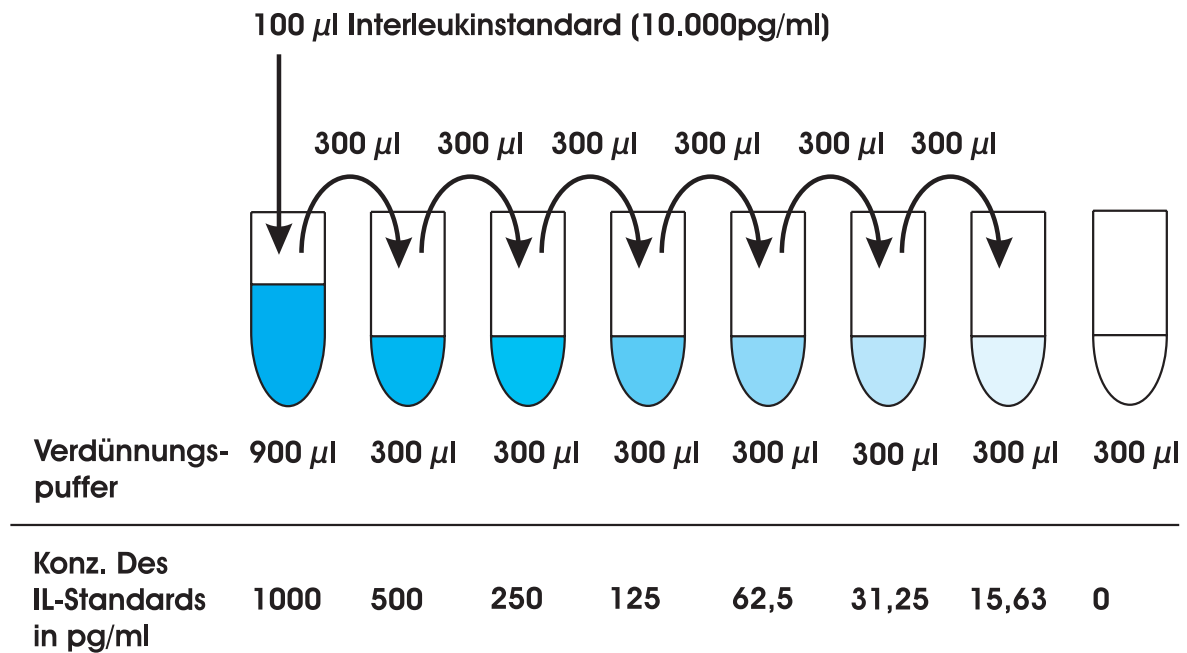


Abbildung 3: Herstellung der Verdünnungsreihe des Interleukinstandards

Im Anschluss daran wurden in jeden Well 200 µl Blockingpuffer (PBS mit 4 % Rinderserumalbumin, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Nach dem erneuten Abkleben mit Folie wurde die Mikrotiterplatte 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Blockingpuffer wurde durch Abklopfen entfernt und die freien Reaktanden wurden durch dreimaliges Spülen der Wells mit jeweils 300 µl Waschlösung (TBS Tween, Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland) entfernt.

In der Zwischenzeit wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit einem IL-Standard vorbereitet. Dafür wurden acht Cryoröhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) durchnummeriert (1-8). Der Standard mit der höchsten Konzentration enthielt 1.000 pg/ml des jeweiligen Interleukins und wurde mit Verdünnungspuffer (PBS + 0.4% Rinderserumalbumin) linear verdünnt (siehe Abbildung 3). Für die Negativkontrolle wurde das letzte Cryoröhrchen nur mit Verdünnungspuffer versehen. Die zu untersuchenden Proben wurden aufgetaut und sortiert. Anschließend wurden die Standards 1-8 in die erste und zweite Spalte der Mikrotiterplatte pipettiert und die Proben in die anderen Wells. Auf alle Wells wurde 50 µl des Detection-Antikörpers pipettiert, der zuvor laut Herstellerangaben in 5 ml Verdünnungspuffer gelöst worden war. Für weitere 2 h wurde die Mikrotiterplatte abgeklebt und bei Raumtemperatur auf einen Rüttler gestellt.

Nach dem Entfernen der Proben und der Detection-AK-Lösung aus den Wells wurden die Platten wie oben beschrieben mit TBS-Tween gewaschen und daran anschließend je Well 100  $\mu$ l einer nach Herstellerangaben konjugierten Streptavidinlösung pipettiert. Diese Lösung bindet an vorhandene Antikörper. Nach dem Abkleben der Mikrotiterplatte wurde diese für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem nächsten Waschschrift wurden je 100  $\mu$ l TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland) auf jeden Well pipettiert. TMB ist das Substrat für das Enzym Streptavidin und es erfolgt bei Umsetzung des Substrates ein Farbumschlag nach blau. Die Mikrotiterplatte wurde nun für 30-45 min im Dunkeln aufbewahrt, bis sich im Bereich der Interleukin-Standards ein deutlicher Niederschlag unterschiedlicher Intensität gebildet hatte. Um die Reaktion zu stoppen, wurden in jeden Well 50  $\mu$ l einmolare Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pipettiert, wobei eine Farbänderung der blau gefärbten Lösungen in gelb erfolgte.

Die Messung der Konzentration der Interleukine wurde im ELISA-Reader durchgeführt, wobei die Berechnung der IL-Konzentrationen der Proben über die Standardkurve erfolgte.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Zahl der adhärenenten, invasiven und frei vorkommenden Bakterien

In den folgenden Abbildungen wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) von *Porphyromonas gingivalis* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Bezug auf die unterschiedlichen getesteten Metronidazolkonzentrationen gegenüber Kontrollversuchen ohne Antibiotikazusatz zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 6 und 18 h) dargestellt. Dabei wurden adhärenente, invasive und freie Bakterien betrachtet.

Bei der Aufbereitung der Daten wurde eine Normierung der Werte durchgeführt, um die Ergebnisse der Versuche miteinander vergleichen zu können. Dafür wurde für alle Versuche ein Mittelwert der Kontrollwerte (ohne Metronidazolzusatz) für jeden untersuchten Zeitpunkt (1, 6 und 18 h) gebildet. Aus dem so gebildeten Kontrollwert und dem eigentlich gemessenen Wert wurde jeweils ein Faktor ermittelt, mit dem alle Werte des jeweiligen Versuches skaliert wurden.

Für die Darstellung der Kolonie bildenden Einheiten der Bakterien wurden Säulendiagramme mit logarithmischer Skalierung verwendet. Darin wird durch die Höhe der Säulen der Medianwert gekennzeichnet, während die Fehlerbalken die jeweiligen Maximal- und Minimalwerte wiedergeben.

In allen Versuchen war die Anzahl der freien Bakterien größer als die der adhärenenten und invasiven. Die wenigsten KBE wurden jeweils bei den invasiven Bakterien gemessen. Dabei wurden bei den Versuchen jeweils ca.  $10^6$ - $10^7$  freie Bakterien,  $10^5$ - $10^6$  adhärenente Bakterien und etwa  $10^4$ - $10^5$  invasive Bakterien detektiert.

#### 5.1.1 Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol

##### *Porphyromonas gingivalis*

Abbildung 4 zeigt, dass die Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol lediglich bei einzelnen Messwerten zu einer Reduktion von adhärenenten, invasiven und freien Bakterien von *P. gingivalis* führte (siehe auch die Tabellen 2, 3 und 4 im Anhang).

Die getesteten Metronidazolkonzentrationen erzielten bei den adhärenenten Bakterien kei-



nen deutlichen antibakteriellen Effekt. Die Medianwerte lagen nach 1 und 6 h nur nach Einwirken von 100  $\mu\text{g/ml}$  Metronidazol geringfügig unterhalb des jeweiligen Kontrollwertes. Nach 18 h konnten keine adhärenen Bakterien unterhalb des entsprechenden Referenzwertes festgestellt werden.

Der Einfluss der getesteten Metronidazolkonzentrationen auf invasive Bakterien war ebenfalls gering. Während nach 1 h nur bei 1/4 MHK eine minimale Verminderung der Kolonie bildenden Einheiten registriert werden konnte, war im Gegensatz dazu nach 6 und 18 h bei den Metronidazolkonzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{g/ml}$  ein leichter Rückgang der invasiven Bakterien zu verzeichnen.

Bei den freien Bakterien wurde nach 6 h eine deutliche Verminderung bei Zugabe von 10 und 100  $\mu\text{g/ml}$  Metronidazol festgestellt, jedoch zeigte sich nach 18 h kein Einfluss des Metronidazols auf die Anzahl der KBE.

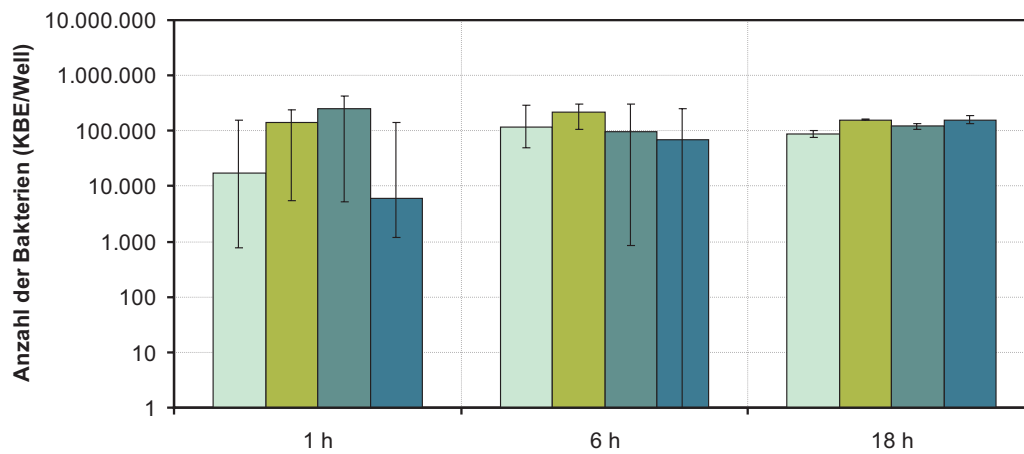
### **Actinobacillus actinomycetemcomitans**

Abbildung 5 zeigt die für *A. actinomycetemcomitans* bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol erzielten Ergebnisse. Dabei konnte nur eine geringe antibakterielle Wirkung ermittelt werden (siehe auch die Tabellen 11, 12 und 13 im Anhang).

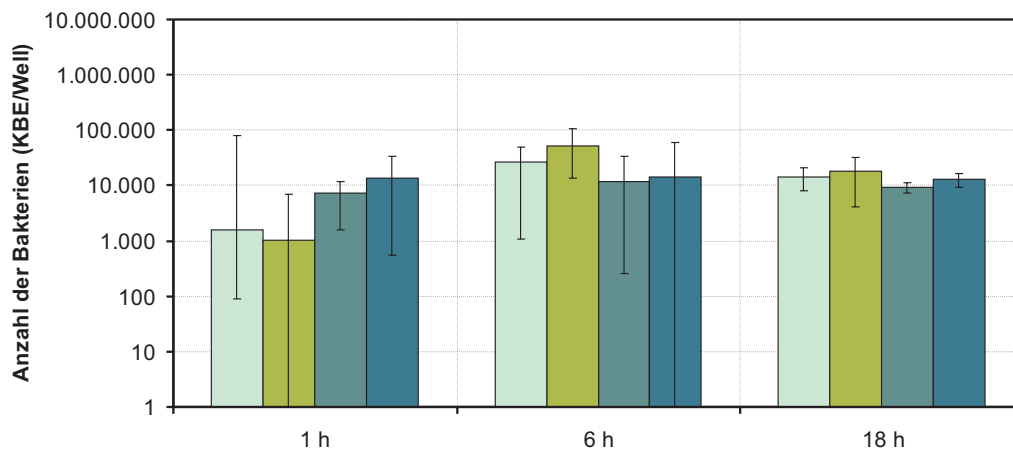
Bei der Beurteilung der adhärenen Bakterien stellte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Kolonie bildenden Einheiten nach 1 h von geringem Ausmaß heraus. Für die Zeitpunkte 6 und 18 h konnten jedoch keine niedrigeren Bakterienzahlen im Vergleich zum jeweiligen Kontrollwert konstatiert werden.

Bei den invasiven Bakterien wurden ebenfalls geringe konzentrationsabhängige Reduktionen der koloniebildenden Einheiten sowohl nach 1 als auch nach 18 h detektiert. Im Vergleich dazu war nach 6 h kein antibakterieller Effekt des Metronidazols auf die invasiven Bakterien feststellbar.

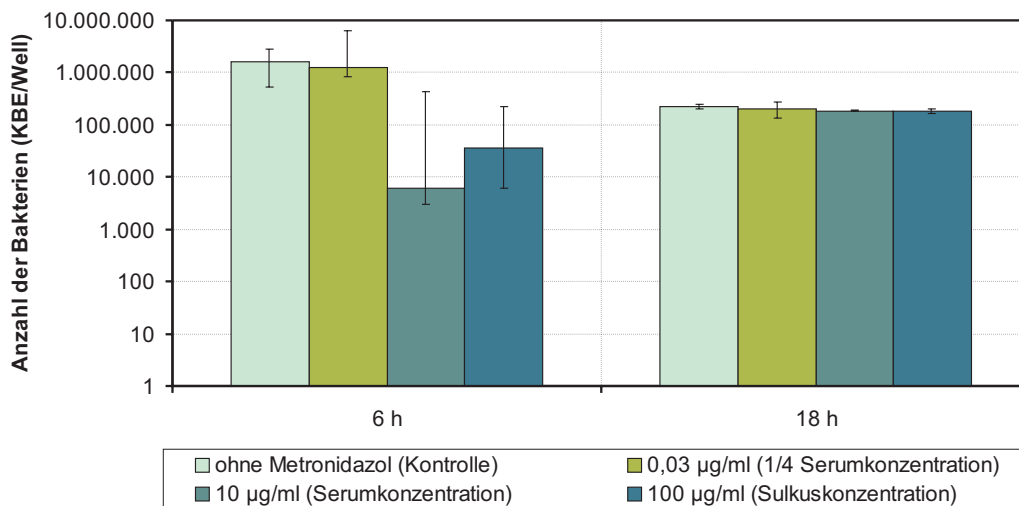
Bei den freien Bakterien zeigte sich kein Einfluss der getesteten Metronidazolkonzentrationen auf die Anzahl der KBE. Lediglich der Medianwert bei 10  $\mu\text{g/ml}$  nach 6 h lag minimal unterhalb des Kontrollwertes.



(a) adhärenente Bakterien

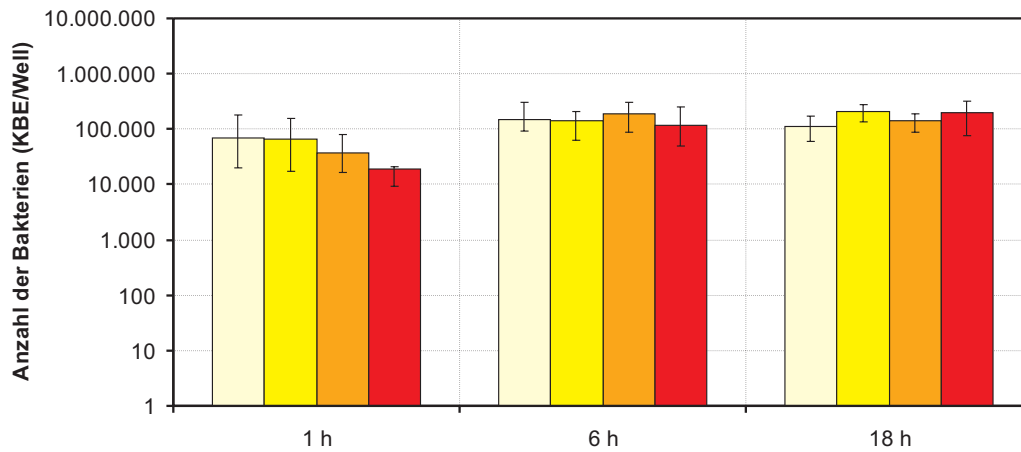


(b) invasive Bakterien

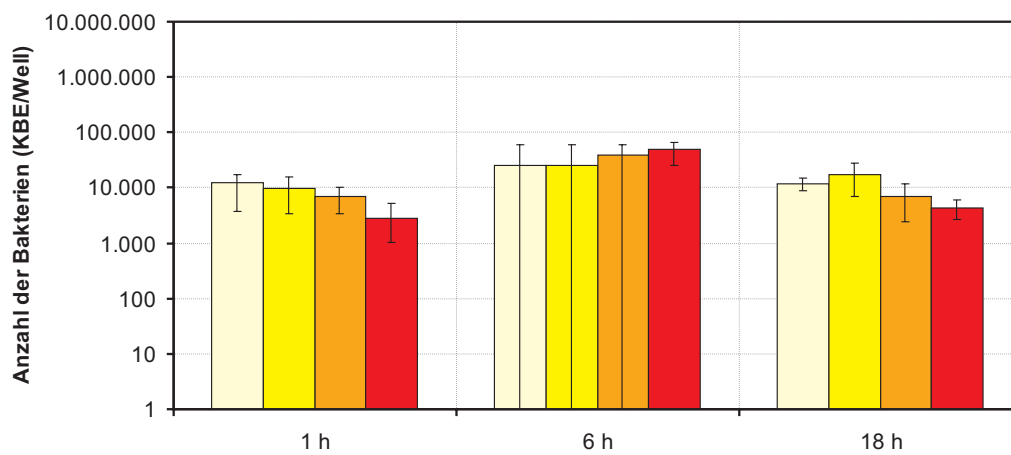


(c) freie Bakterien

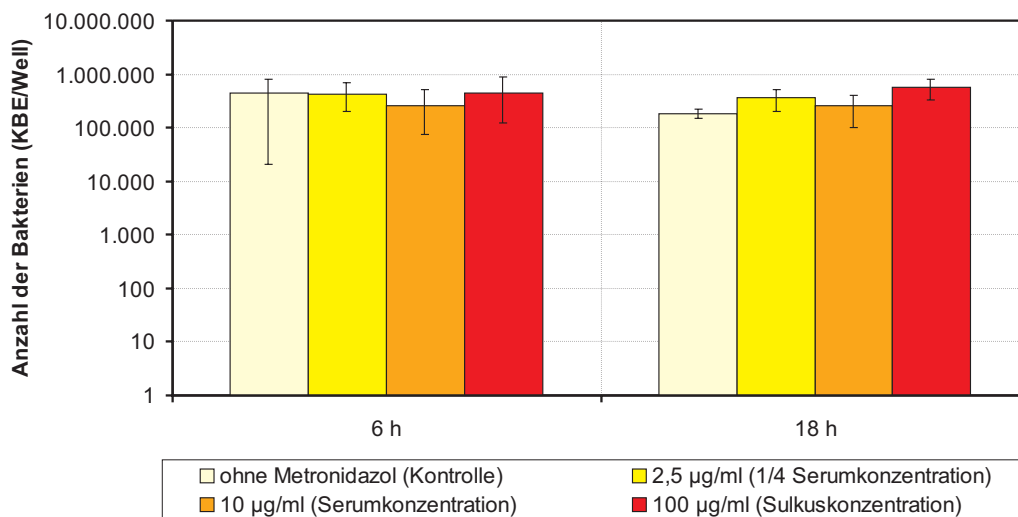
Abbildung 4: *Porphyromonas gingivalis* - Anzahl der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen.



(a) adhärenente Bakterien



(b) invasive Bakterien



(c) freie Bakterien

Abbildung 5: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - Anzahl der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen

### 5.1.2 Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol

#### ***Porphyromonas gingivalis***

Die Vorinkubation von *P. gingivalis* mit Metronidazol führte im Ergebnis zu kaum feststellbaren Reduktionen der Bakterien, ohne eine Elimination des Bakteriums zu erreichen (siehe Abbildung 6 und die Tabellen 5, 6 und 7 im Anhang).

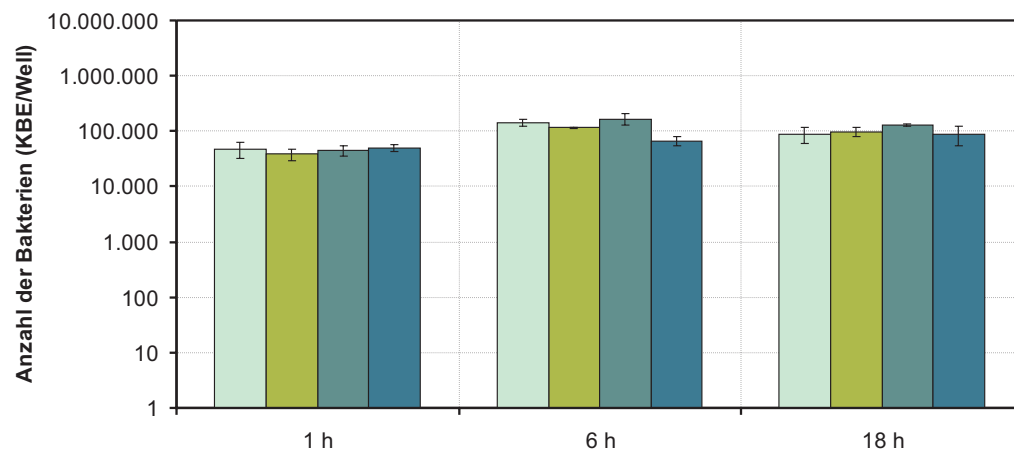
Ein leichter antibakterieller Effekt konnte bei den adhärenen Bakterien nur bei der höchsten getesteten Metronidazolkonzentration nach 6 h ermittelt werden.

Die Anzahl der invasiven Bakterien wurde durch die Vorinkubation mit Metronidazol kaum beeinflusst. Eine sehr geringe Abnahme war nach 6 h in Abhängigkeit der Metronidazolkonzentration festzustellen. Im Unterschied dazu stiegen die Kolonie bildenden Einheiten nach 18 h unter Metronidazoleinfluss im Vergleich zur Kontrolle an, allerdings war dieser Effekt nicht proportional zur verwendeten Dosis des Medikaments.

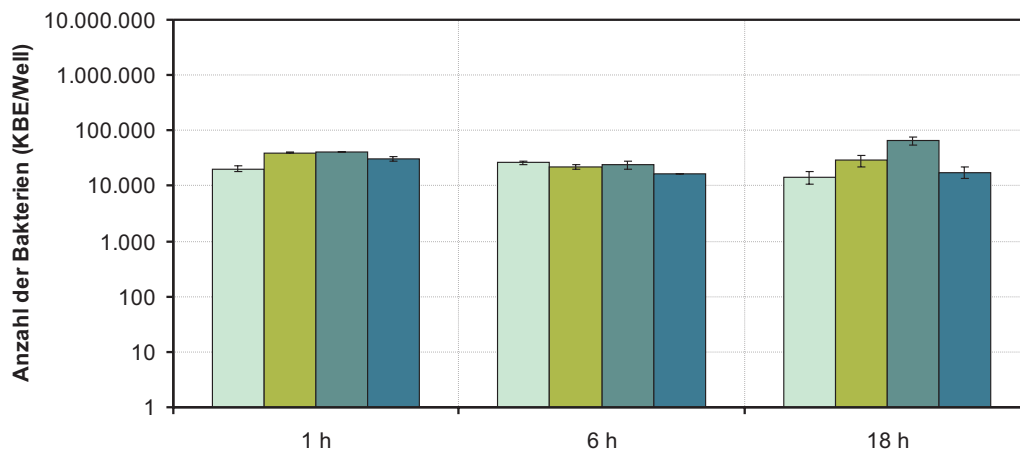
Bei den nicht adhärenen Bakterien war ein geringfügiger antibakterieller Effekt bei allen getesteten Metronidazolkonzentrationen nach 6 h messbar. Dagegen konnte nach 18 h ein Ansteigen der Anzahl der freien Bakterien unter dem Einfluss des Metronidazols ermittelt werden.

#### ***Actinobacillus actinomycetemcomitans***

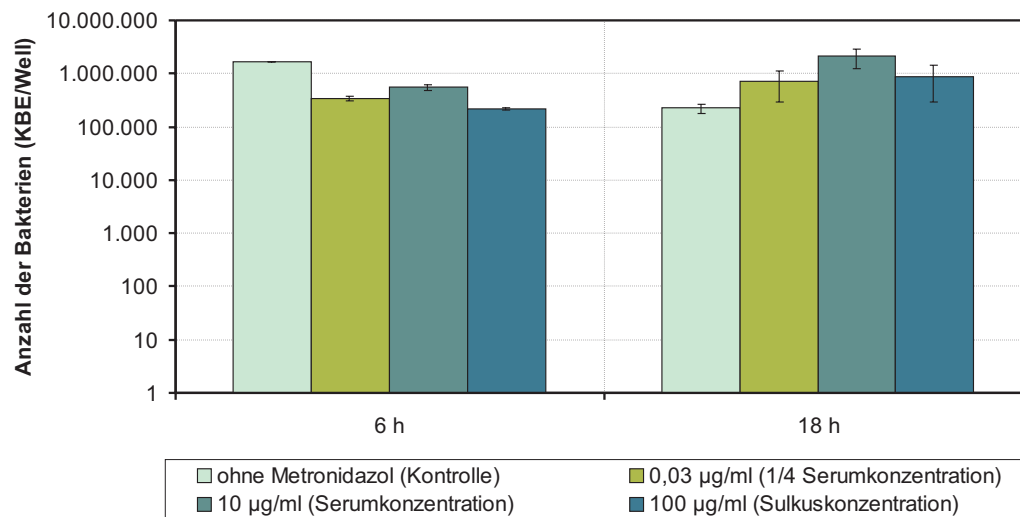
Bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol konnten nur einzelne Messwerte geringfügig unterhalb der jeweiligen Kontrollwerte ermittelt werden, z. B. bei 1/4 MHK nach 1 h bei den adhärenen Bakterien sowie bei 1/4 MHK und 100 µg/ml bei den freien Bakterien nach 1 h. Dagegen kam es zum Zeitpunkt von 18 h zu einem Anstieg der Anzahl sowohl adhärenter, invasiver als auch freier Bakterien unter dem Einfluss von Metronidazol (siehe Abbildung 7 und die Tabellen 14, 15 und 16 im Anhang).



(a) adhärenente Bakterien

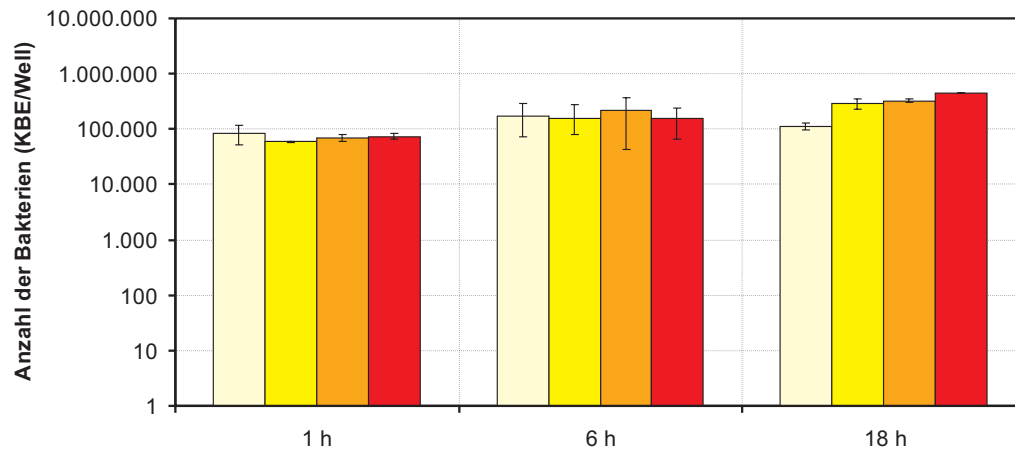


(b) invasive Bakterien

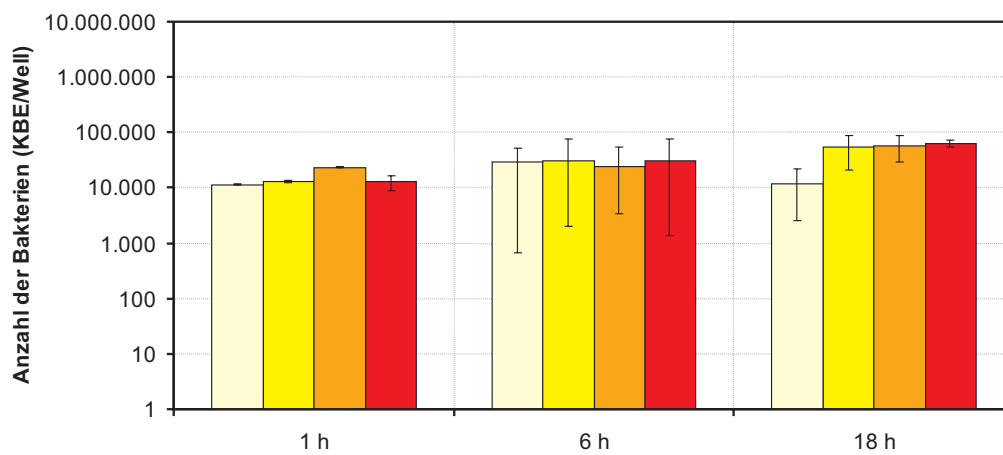


(c) freie Bakterien

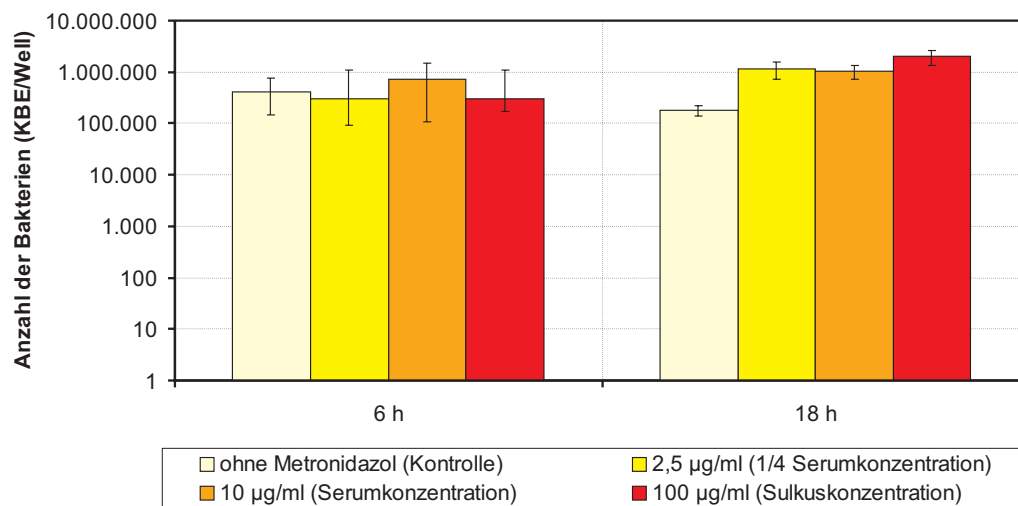
Abbildung 6: *Porphyromonas gingivalis* - Anzahl der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen.



(a) adhärenente Bakterien



(b) invasive Bakterien



(c) freie Bakterien

Abbildung 7: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - Anzahl der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen.

### 5.1.3 Zugabe des Metronidazols bei Infektion der Zellen

#### ***Porphyromonas gingivalis***

In Abbildung 8 ist die Anzahl der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion dargestellt. Lediglich bei einzelnen Messwerten konnte eine Reduktion der Bakterienzahlen unter dem Einfluss des Metronidazols verzeichnet werden (siehe auch die Tabellen 8, 9 und 10 im Anhang).

Bei den adhärenenten Bakterien ließen sich leicht verminderte Bakterienzahlen bei 10 µg/ml Metronidazol nach 18 h feststellen.

Die Anzahl der invasiven Bakterien sank ebenso sowohl nach 1 h als auch nach 6 h bei 10 und 100 µg/ml Metronidazol leicht ab. Nach 18 h konnte ein antibakterieller Effekt auf die invasiven Bakterien jedoch nicht festgestellt werden.

Die Zahl der freien Bakterien war zum Zeitpunkt von 6 h bei 10 und 100 µg/ml Metronidazol im Vergleich zum Kontrollwert leicht verringert, nach 18 h war keine Verminderung der Bakterienzahl messbar.

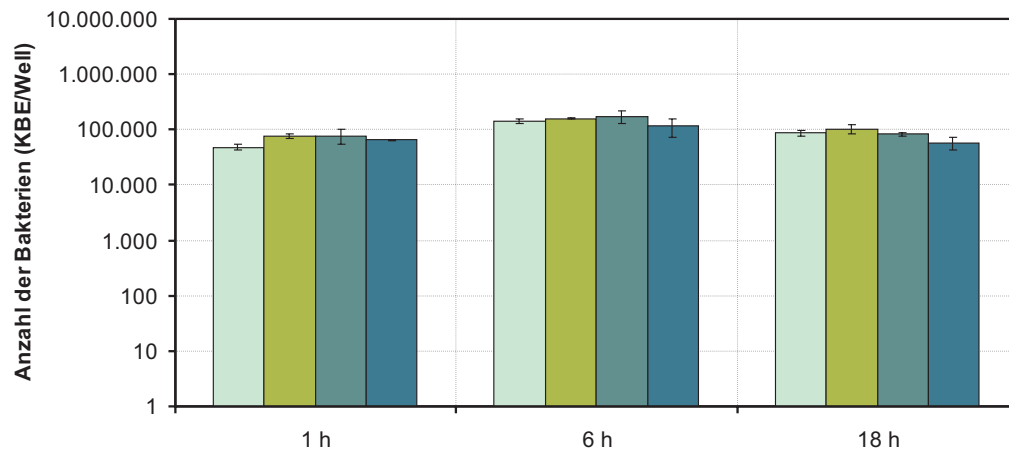
#### ***Actinobacillus actinomycetemcomitans***

Abbildung 9 zeigt die Anzahl der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen. Lediglich einzelne Messwerte konnten unterhalb der jeweiligen Kontrollwerte detektiert werden. Eine Elimination des Bakteriums wurde nicht erreicht (siehe auch die Tabellen 17, 18 und 19 im Anhang).

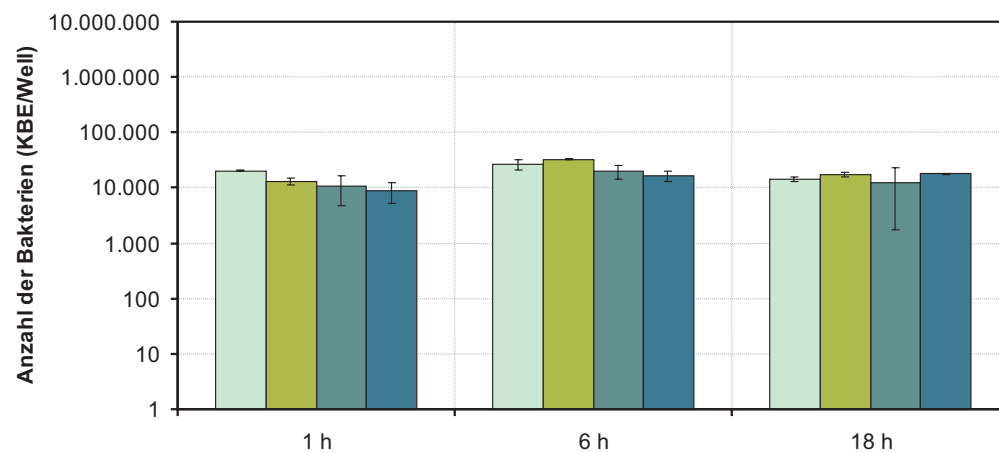
Bei den adhärenenten Bakterien konnten nur nach 6 und 18 h bei einer Metronidazolkonzentration von 10 µg/ml leicht verminderte Messwerte ermittelt werden. Die Anzahl der adhärenenten Bakterien nach 18 h stieg bei 100 µg/ml deutlich an.

Die Anzahl der invasiven Bakterien verminderte sich leicht nach 6 h bei allen getesteten Metronidazolkonzentrationen sowie nach 18 h bei einer Konzentration von 10 µg/ml.

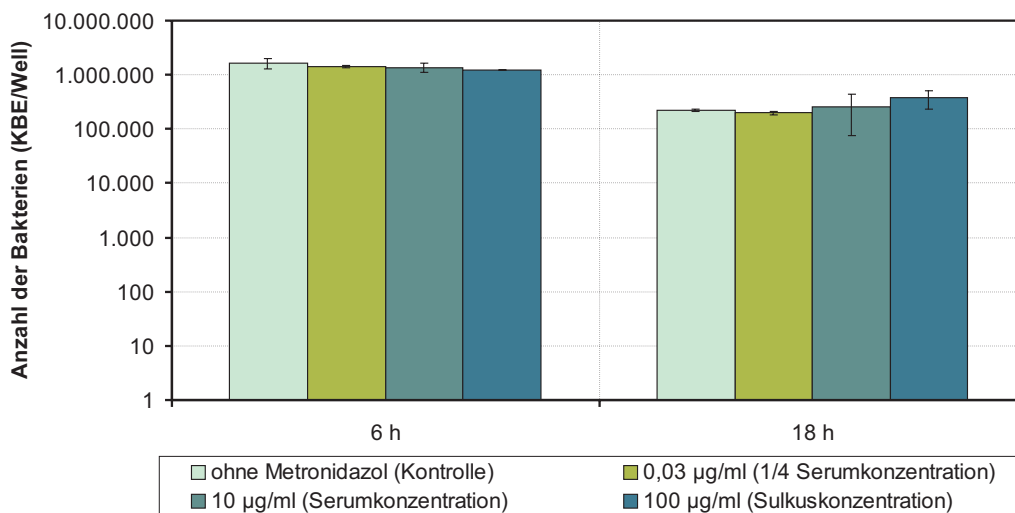
Ein antibakterieller Einfluss auf die freien Bakterien war nicht festzustellen. Im Gegenteil, die Anzahl der freien Bakterien stieg nach 18 h bei der höchsten getesteten Metronidazolkonzentration an.



(a) adhärenente Bakterien



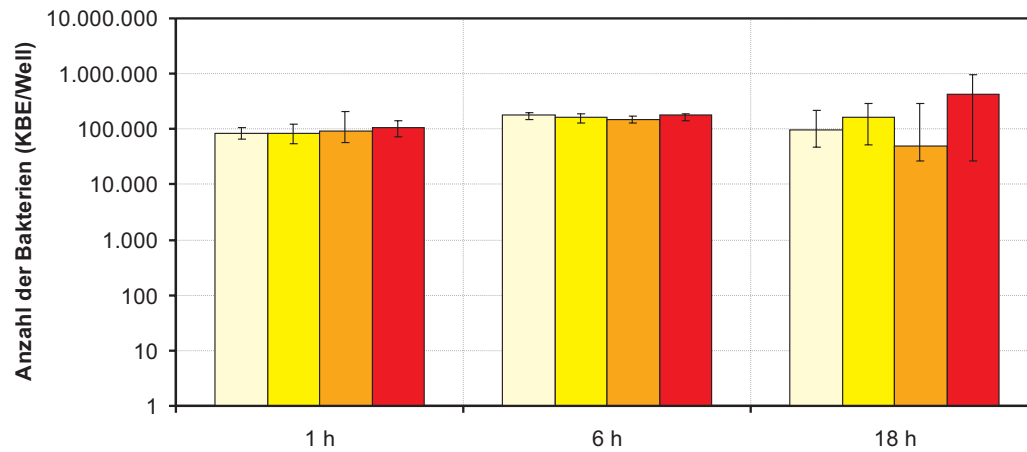
(b) invasive Bakterien



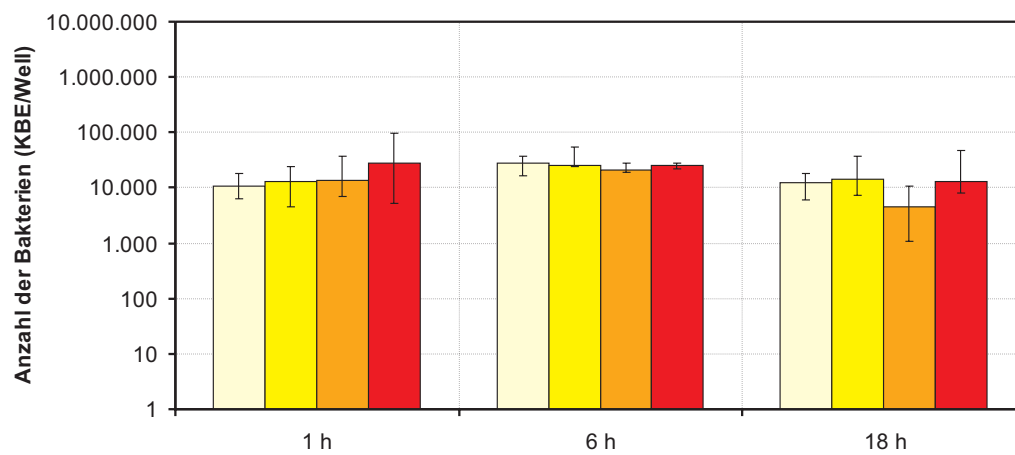
(c) freie Bakterien

Abbildung 8: *Porphyromonas gingivalis* - Anzahl der adhärenente, invasiven und freien Bakterien bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen.

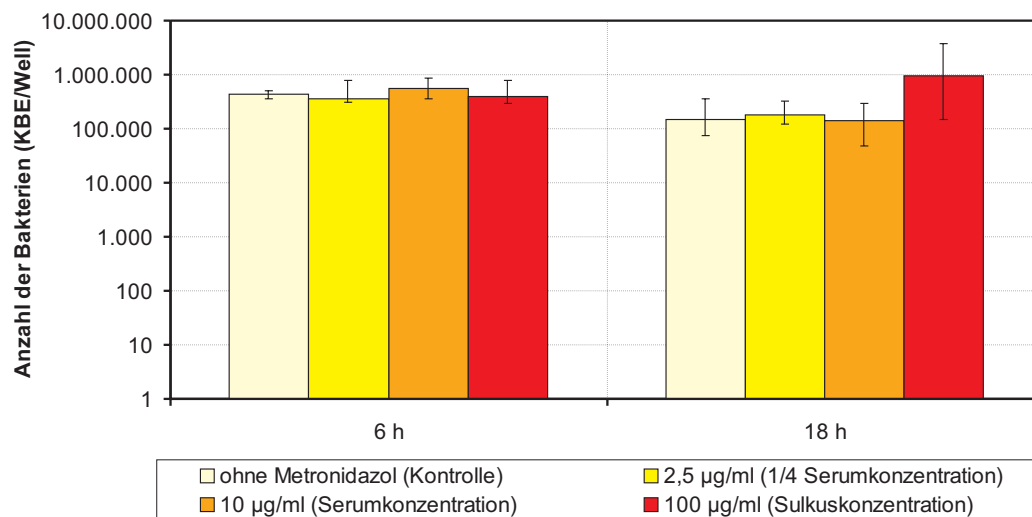




(a) adhärenente Bakterien



(b) invasive Bakterien



(c) freie Bakterien

Abbildung 9: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - Anzahl der adhärenenten, invasiven und freien Bakterien bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen.

## 5.2 Auswertung der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta_1$ und TNF- $\alpha$

### Grafische Darstellung der Interleukinauswertung

Im Folgenden werden die Konzentrationen der von den Zellen abgegebenen Zytokine zu den untersuchten Zeitpunkten 1 h, 6 h und 18 h in Säulendiagrammen dargestellt. Dabei wird der Einfluss der unterschiedlichen Metronidazolkonzentrationen sowie der Einfluss der Bakterien auf die Konzentration der Zytokine berücksichtigt. Als Referenz dient eine Kontrolle, bei der die Zellen weder mit Bakterien infiziert noch mit Metronidazol inkubiert wurden. Der jeweilige Referenzwert, der der Zytokinbildung der Zellen pro Zeiteinheit ohne Einfluss von Metronidazol oder Bakterien entspricht, wird durch die sich im Diagramm am weitesten links befindende Säule dargestellt.

#### 5.2.1 Interleukin-8

Abbildung 10 zeigt die IL-8-Konzentrationen, die bei den Versuchen “Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol”, “Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol” und “Zugabe des Metronidazols bei Infektion der Zellen” gemessen wurden. Die entsprechenden Werte sind in den Tabellen 20, 21 und 22 im Anhang dargestellt.

#### Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol

Bei den mit *P. gingivalis* durchgeführten Versuchen konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt weder mit, noch ohne Metronidazol IL-8 nachgewiesen werden. Bei den Kontrollversuchen ohne Bakterien und bei den Versuchen mit *A. actinomycetemcomitans* konnten im zeitlichen Verlauf (untersuchte Zeitpunkte: 1 h, 6 h, 18 h) jeweils ansteigende IL-8 Konzentrationen festgestellt werden. Nach 18 h wurde eine Relation zwischen steigender Metronidazolkonzentration und steigender IL-8 Konzentration ersichtlich.

#### Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol

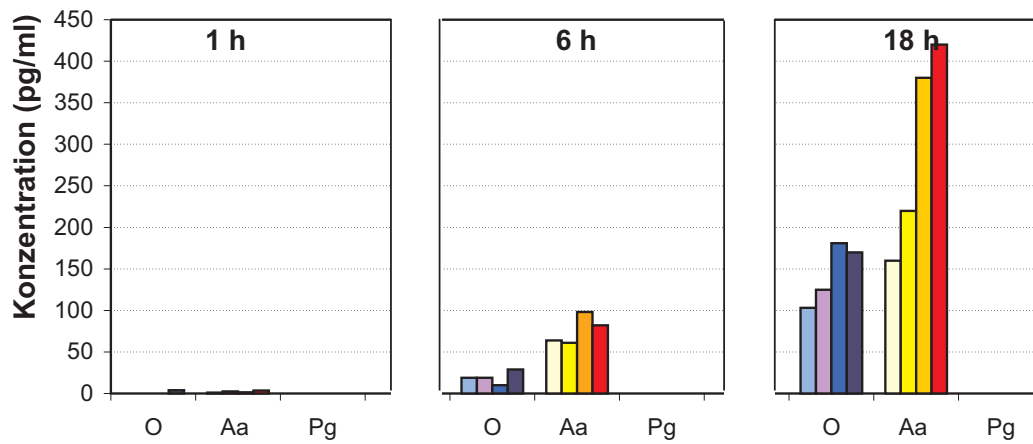
Auch bei diesem Versuchsaufbau konnte kein IL-8 bei *P. gingivalis* nachgewiesen werden. Bei dem untersuchten Zeitpunkt von 1 h war nur bei einer Konzentration des Metronidazols von 100  $\mu\text{g/ml}$  bei *A. actinomycetemcomitans* IL-8 in einer Konzentration von 0,1 pg/ml

nachweisbar. Bei den Versuchen mit *A. actinomycetemcomitans* hingegen stieg sowohl nach 6 h als auch nach 18 h mit der Konzentration des Metronidazols auch die Konzentration des IL-8 an.

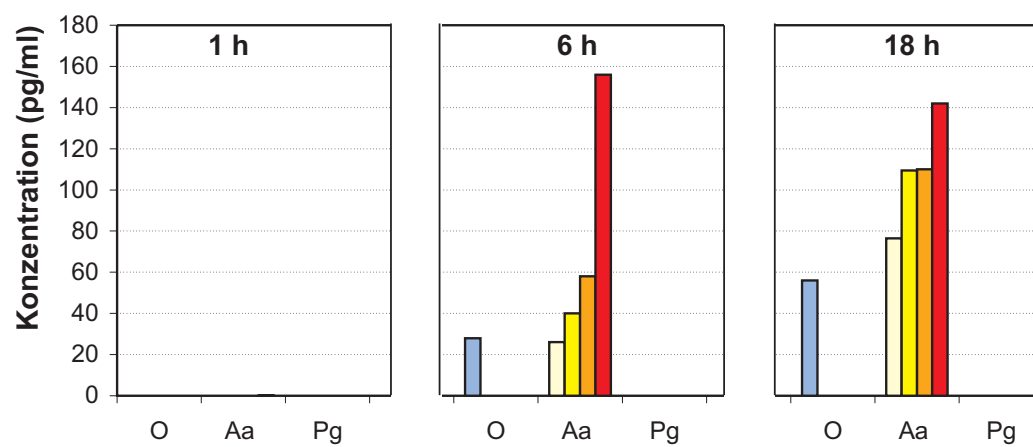
### **Zugabe zum Zeitpunkt der Infektion**

Zum untersuchten Zeitpunkt von 1 h war kein IL-8 nachweisbar. Bei den Versuchen mit *P. gingivalis* konnte nach 6 h bei der Sulkuskonzentration des Metronidazols ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ) IL-8 in einer Konzentration von  $122\ \text{pg/ml}$  detektiert werden. Die Versuche mit *P. gingivalis* nach 18 h ergaben keine nachweisbare IL-8 Konzentration.

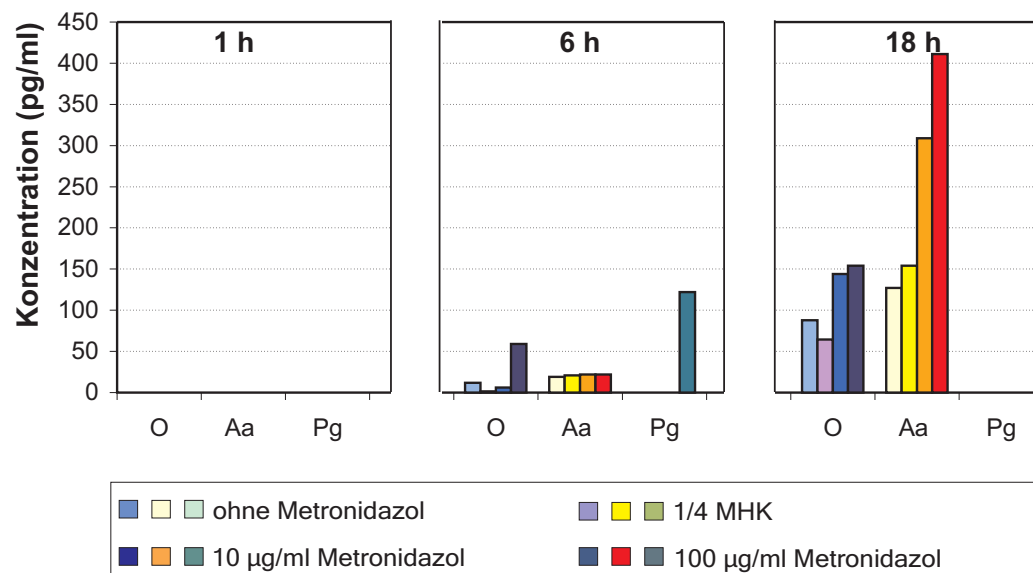
Die IL-8 Konzentrationen bei den Versuchen ohne Bakterien und mit *A. actinomycetemcomitans* stiegen im zeitlichen Verlauf an. Bei *A. actinomycetemcomitans* konnte nach 18 h eine von der Konzentration des Metronidazols abhängige Steigerung der IL-8 Produktion der KB-Zellen gemessen werden.



(a) Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol



(b) Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol



(c) Zugabe des Metronidazols bei Infektion der Zellen

Abbildung 10: Freisetzung von IL-8 aus KB-Zellen ohne Bakterien (O) und unter dem Einfluss von *A. actinomycetemomitans* (Aa) und *P. gingivalis* (Pg). Die Legende zeigt die Zuordnung der jeweils vier betrachteten aufsteigenden Metronidazolkonzentrationen.

### 5.2.2 TGF- $\beta_1$

In Abbildung 11 wurden die Konzentrationen des TGF- $\beta_1$  bei den Versuchen “Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol”, Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol” und Zugabe des Metronidazols bei Infektion der Zellen” dargestellt (siehe auch die Tabellen 23, 24 und 24 im Anhang).

#### Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol

Bei diesem Versuch konnte einerseits zu allen gemessenen Zeitpunkten (1 h, 6 h, 18 h) und andererseits sowohl bei den mit den Bakterien *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* durchgeführten Versuchen als auch bei den Kontrollversuchen ohne Bakterien TGF- $\beta_1$  nachgewiesen werden.

Die Konzentration des TGF- $\beta_1$  war bei den Kontrollversuchen ohne Bakterien zu allen drei Zeitpunkten ähnlich. Dabei war jeweils ein von der Konzentration des Metronidazols abhängiger Anstieg des TGF- $\beta_1$  zu verzeichnen: mit steigender Konzentration des Metronidazols nahm die Konzentration des gebildeten TGF- $\beta_1$  zu.

Die Werte des TGF- $\beta_1$  bei den Versuchen mit *A. actinomycetemcomitans* stiegen nach 18 h an, wobei auch hier eine Korrelation zwischen der Konzentration des Antibiotikums und den gemessenen TGF- $\beta_1$  Konzentrationen bestand. Bei den 1 h und 6 h-Versuchen konnte keine klare Beziehung zwischen der Metronidazolkonzentration und der TGF- $\beta_1$ -Bildung hergestellt werden. Jedoch waren auch hier die TGF- $\beta_1$  Werte bei der höchsten Metronidazolkonzentration (100  $\mu\text{g/ml}$ ) die höchsten.

Die Versuche mit *P. gingivalis* ergaben nach 1 h die größte Konzentration von TGF- $\beta_1$ . Die Werte stiegen mit zunehmender Antibiotika-Konzentration an. Eine Ausnahme bildete der Wert für die höchste Metronidazolkonzentration. Hier wurde die niedrigste Konzentration des TGF- $\beta_1$  gemessen. Nach 6 h fielen die TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen mit steigender Metronidazolkonzentration ab, wobei der Wert für die niedrigste Metronidazolkonzentration (1/4 MHK) aus dieser Aussage ausgeklammert werden muss. Nach 18 h konnten keine Konzentrationsunterschiede festgestellt werden.

### **Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol**

Die Konzentration des TGF- $\beta_1$  sank im zeitlichen Verlauf ohne Einfluss der Bakterien und Metronidazol leicht ab.

Die TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen bei den Versuchen mit *A. actinomycetemcomitans* waren nach 1 h am größten, wobei hier keine Korrelation zwischen der Antibiotikakonzentration und den Werten des TGF- $\beta_1$  hergestellt werden konnte. Im zeitlichen Verlauf wurden die Werte des TGF- $\beta_1$  niedriger, wobei nach 6 h die Werte mit steigender Metronidazolkonzentration angestiegen waren, während sie nach 18 h abfielen.

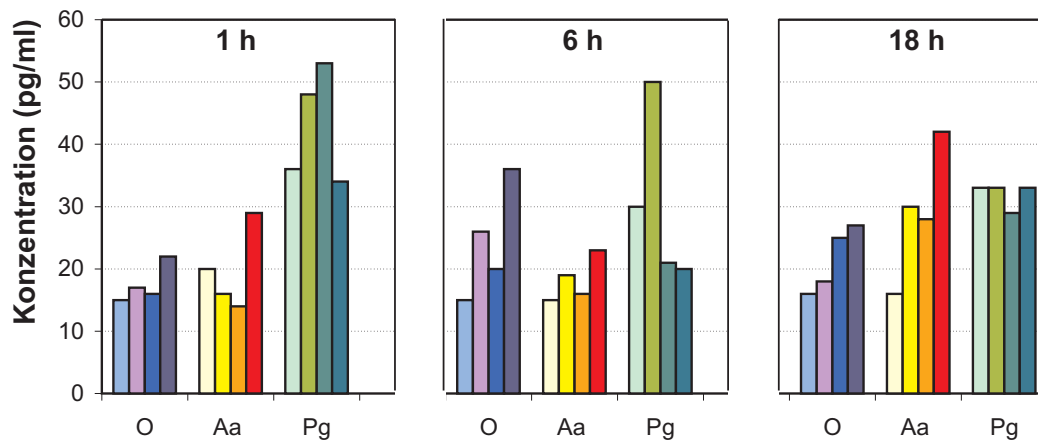
Die Versuche mit *P. gingivalis* ergaben ähnlich hohe TGF- $\beta_1$ -Werte nach 1 h und 6 h wie bei *A. actinomycetemcomitans*, die im Vergleich dazu nach 18 h deutlich niedriger waren. Während nach 6 h und 18 h eine Korrelation zwischen der Metronidazolkonzentration und der Menge des gebildeten TGF- $\beta_1$  nachgewiesen werden konnte, war eine solche Aussage für die Ergebnisse des 1 h-Versuches nicht möglich.

### **Zugabe zum Zeitpunkt der Infektion**

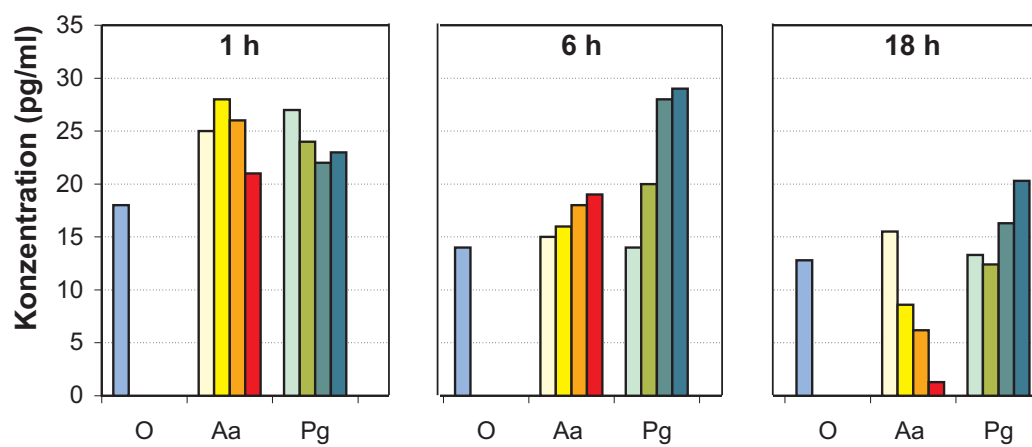
Die Kontrollversuche ohne Bakterien ergaben zu allen drei untersuchten Zeitpunkten TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen im gleichen Bereich. Während nach 1 h die TGF- $\beta_1$ -Werte mit steigender Metronidazolkonzentration anstiegen, war dies bei den Werten für 6 h und 18 h nicht gegeben. Die TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen lagen hier unabhängig von der Metronidazolkonzentration auf dem gleichen Niveau.

Die Konzentration des TGF- $\beta_1$  erhöhte sich bei den Versuchen mit *A. actinomycetemcomitans* im zeitlichen Verlauf. Ein Zusammenhang zwischen Metronidazolkonzentration und TGF- $\beta_1$ -Konzentration konnte nicht nachgewiesen werden.

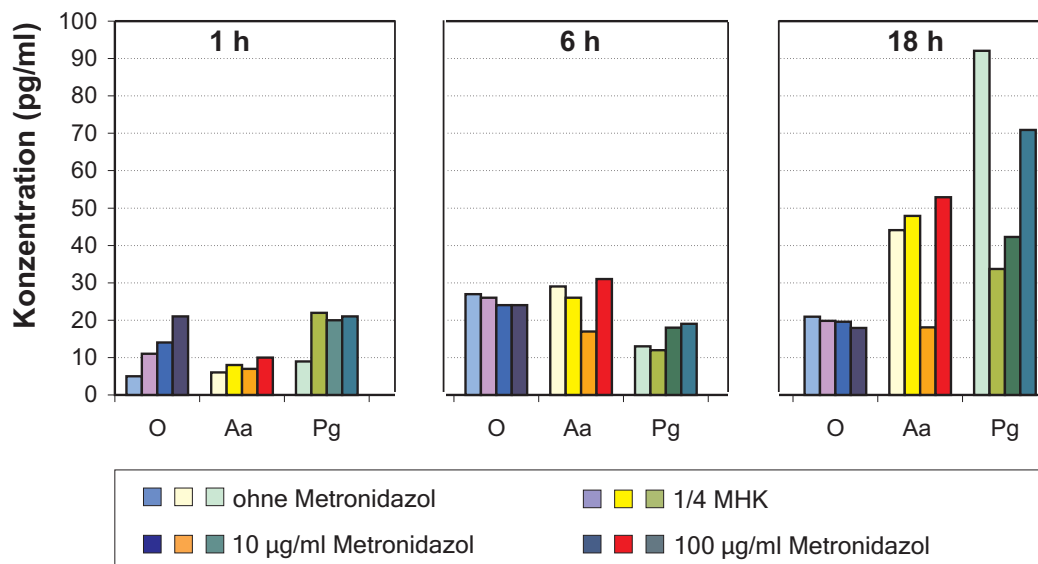
Die Werte des TGF- $\beta_1$  lagen bei den Versuchen mit *P. gingivalis* nach 1 h und 6 h auf gleicher Höhe. Im Vergleich dazu stiegen die TGF- $\beta_1$ -Werte nach 18 h an. Dabei war die Konzentration des TGF- $\beta_1$  bei dem Versuchsansatz ohne Metronidazol am höchsten.



(a) Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol



(b) Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol



(c) Zugabe des Metronidazols bei Infektion der Zellen

Abbildung 11: Freisetzung von TGFβ<sub>1</sub> aus KB-Zellen ohne Bakterien (O) und unter dem Einfluss von A. actinomycetemcomitans (Aa) und P. gingivalis (Pg). Die Legende zeigt die Zuordnung der jeweils vier betrachteten aufsteigenden Metronidazolkonzentrationen.

### 5.2.3 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$

Bei allen durchgeführten Versuchen konnte keine Konzentration von IL-1 $\beta$ , IL-6 oder TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden.



## 6 Diskussion

### 6.1 Methodik

Im Konsensusbericht von Genco et al. (1996) wurde den Bakterien *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* eine große Bedeutung bei der Entstehung von parodontalen Erkrankungen zuerkannt. Die bisherige Forschung konnte dazu beitragen, einige, aber längst nicht alle, Details der Interaktion zwischen diesen Bakterien und dem Wirtsorganismus aufzuklären. Auch die dauerhafte Elimination dieser Bakterien aus der Mundhöhle bei infizierten Personen stellt heute noch ein Problem dar. Aus diesen Gründen haben wir uns für die Untersuchung dieser beiden Bakterien in unserer Arbeit entschieden.

Die Durchführung der Versuche erfolgte an KB-Zellen. Dabei handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die einem oralen Epidermoidkarzinom entstammt. An dieser Zellreihe gelang erstmals der Nachweis, dass *A. actinomycetemcomitans* in Epithelzellen eindringt (Meyer et al. 1991). In dieser Studie wurden vier verschiedene Epithelzelllinien mit dem Ergebnis getestet, dass die meisten Kolonie bildenden Einheiten von *A. actinomycetemcomitans* in KB-Zellen zu detektieren waren. Seither wurden verschiedene Studien, deren Ziel die Untersuchung von Adhärenz und Internalisierung oraler Pathogene war, an KB-Zellen durchgeführt (Duncan et al. 1993, Meyer und Fives-Taylor 1994, Sreenivasan et al. 1993b, Brisette und Fives-Taylor 1999). Unter anderem konnte dabei bewiesen werden, dass *A. actinomycetemcomitans* auch über die Fähigkeit verfügt, an KB-Zellen zu adhären (Meyer und Fives-Taylor 1994). Bei den Untersuchungen, die mit *P. gingivalis* und KB-Zellen durchgeführt wurden, konnten ebenso Adhärenz (Duncan et al. 1993, Eick et al. 2002) und Internalisierung (Lamont et al. 1992) des Bakteriums festgestellt werden. Da wir unter anderem die antibakterielle Wirkung des Metronidazols auf adhärente, invasive und freie Bakterien untersuchen wollten, stellten die bereits erbrachten Nachweise der Adhärenz und Internalisierung von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* bei KB-Zellen einen der Gründe dar, weshalb wir unsere Versuche an KB-Zellen durchgeführt haben.

Ein ebenfalls wichtiger Aspekt für die Auswahl der Zellen war der Vorteil, dass die Versuche an einer permanenten Zelllinie bei vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden konnten und somit zu reproduzierbaren Ergebnissen führten.

Die Tatsache, dass KB-Zellen genetisch transformierte Zellen sind, wirkt sich nachteilig auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf gesunde, nicht neoplastische Zellen aus. Diesbezüglich wurden Unterschiede bei der Adhärenz von *P. gingivalis* ATCC 33277, der unter vielen untersuchten Stämmen von *P. gingivalis* über die größte Kapazität der Adhärenz verfügt, nachgewiesen (Huard-Delcourt et al. 1998). Während *P. gingivalis* ATCC 33277 an 60% der KB-Zellen adhärierte, betrug die Adhärenzquote bei gingivalen Epithelzellen 70%. Veränderungen der Wirtszellmembran oder ihrer Rezeptoren könnten der Grund für die an den beiden Zelltypen festgestellten prozentualen Unterschiede der Adhärenz sein (Huard-Delcourt et al. 1998).

Ein einschichtiger Zellrasen, wie wir ihn für unsere Versuche verwendet haben, kann die komplexen Verhältnisse der parodontalen Anatomie selbstverständlich nicht widerspiegeln. Die Beschränkung auf eine Monolayerschicht der Zellen ermöglichte jedoch Untersuchungen im molekularen Bereich bei der Interaktion zwischen Bakterien und Zellen, wie es Ziel unserer Versuche war.

Viele der Bakterien, die bei der Entstehung von Parodontitiden eine Rolle spielen, sind anaerob. Da Metronidazol ein anaerobes Wirkungsspektrum aufweist, wird es seit den 80-er Jahren häufig zur Eliminierung parodontopathogener Bakterien verwendet. Seine Wirkung auf *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* wird in verschiedenen Studien unterschiedlich bewertet. Die Tatsache, dass bisher keine In-vitro-Studie über die Wirkung von Metronidazol auf adhärente, invasive und freie parodontopathogene Bakterien durchgeführt wurde, waren Motivation für uns, eine Studie mit diesem Antibiotikum durchzuführen.

In verschiedenen klinischen Studien zur Pharmakokinetik des Metronidazols wurde bereits untersucht, in welcher Konzentration sich Metronidazol einerseits im Serum nach systemischer Applikation und andererseits in der Sulkusflüssigkeit nach lokaler Applikation eines Metronidazolgels anreichert. Während nach einmaliger systemischer Applikation von 750 mg Metronidazol innerhalb eines Zeitraumes von 8 h bei allen getesteten Personen eine Serumkonzentration von mehr als 10 µg/ml erreicht wurde (van Oosten et al. 1986), konnte bei einmaliger lokaler Applikation eines 25%-igen Metronidazolgels eine Konzentration von über 100 µg/ml Metronidazol bei allen getesteten Personen nach 4 h in der Sulkusflüssigkeit festgestellt werden (Stoltze 1992).

Anlehnend an diese Studien haben wir bei unseren Versuchen unter anderem die Metronidazolkonzentrationen  $10\mu\text{g/ml}$  (Serumkonzentration bei systemischer Applikation) und  $100\mu\text{g/ml}$  (Sulkusflüssigkeitskonzentration bei lokaler Applikation) getestet, um in unserer Arbeit klinisch relevante Ergebnisse erzielen zu können (van Oosten et al. 1986, Stoltze 1992).

Die Durchführung unserer Versuche mit noch höheren Metronidazolkonzentrationen erscheint wenig sinnvoll, da gezeigt werden konnte, dass bei der klinischen Applikation der empfohlenen Dosierungsmengen von Metronidazol keine höheren Konzentrationen im Serum bzw. der Sulkusflüssigkeit erreicht werden können (van Oosten et al. 1986, Stoltze 1992).

Bei Versuchen von Metronidazol mit PMNs konnte herausgefunden werden, dass die intrazelluläre Konzentration von Metronidazol der extrazellulären Konzentration entspricht und das Antibiotikum mit der Geschwindigkeit lipidlöslicher Substanzen in der Zelle nachweisbar war (Hand et al. 1987). Eine Anreicherung des Metronidazols innerhalb der Zellen war nicht festgestellt worden. Wenn die an PMNs beobachtete intrazelluläre Metronidazolverteilung auch für KB-Zellen zutrifft, könnte es also sein, dass bei unseren Versuchen die intrazelluläre Metronidazolkonzentration kongruent zur extrazellulären Konzentration war.

Wie bereits erwähnt, wurde der Vorgang der Invasion genauer untersucht. Unter anderem wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss die Relation von Bakterien und Zellen auf die Invasion ausübt (Lamont et al. 1995). Dabei wurde herausgefunden, dass bei einem Verhältnis von 100 Bakterien auf 1 Epithelzelle die Anzahl der internalisierten Bakterien mit 12,8% der zu Beginn des Experiments zugegebenen Bakterien größer war als bei allen anderen Bakterien-Zell-Verhältnissen. Anlehnend an diese Studie haben wir dieses Verhältnis von Bakterien zu Zellen bei unseren Versuchen ebenso angewendet. In jedem Well unserer Zellkulturplatten befanden sich  $10^6$  Zellen und  $10^8$  Bakterien.

## 6.2 Wirkung des Metronidazols auf adhärenente, invasive und freie Bakterien von *Porphyromonas gingivalis* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Wir konnten bei unseren Versuchen keine Eliminierung und auch keine deutliche Reduzierung von *P. gingivalis* erzielen. Einige Messwerte könnten für eine geringfügige Wirksamkeit des Metronidazols gegenüber *P. gingivalis* bei der höchsten untersuchten Metronidazolkonzentration (100 µg/ml) sprechen, wobei jedoch keine Eliminierung des Bakteriums erreicht wurde. Auch konnte eine Reduktion der Bakterienzahl bei 100 µg/ml nur bei wenigen Ergebnissen verzeichnet werden, so dass eine eindeutige Aussage über die Wirksamkeit von Metronidazol gegenüber *P. gingivalis* nach unserer Datenlage nicht möglich ist.

Im Hinblick auf die einzelnen Versuche sind die Ergebnisse leicht different: Die Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol hatte keinen Einfluss auf adhärenente oder invasive Bakterien von *P. gingivalis* ATCC 33277. Als Ursache für die in diesem Fall nicht vorhandene Wirksamkeit des Metronidazols gegenüber *P. gingivalis* können pharmakokinetische Eigenschaften des Medikaments in Betracht gezogen werden. Bisher konnte bei PMNs nachgewiesen werden, dass Metronidazol mit der Geschwindigkeit fettlöslicher Substanzen in die Zellen eindringt (Hand et al. 1987). Außerdem ist bekannt, dass das Metronidazol nach Inkubation der Zellen innerhalb kurzer Zeit die gleiche extrazelluläre wie intrazelluläre Konzentration hat. Es kommt also zu einem Konzentrationsausgleich zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Kompartiment. Obwohl bisher keine Untersuchungen darüber bekannt sind, ist es vorstellbar, dass das Metronidazol im Fall einer geringeren extrazellulären Konzentration schnell aus der Zelle herausdiffundiert. Dies könnte in unserem Versuch, nachdem nach einstündiger Einwirkzeit das Medium mit dem Metronidazol von den Zellen entfernt wurde und neues Medium ohne Metronidazol zugegeben wurde, der Fall gewesen sein. Damit wäre die insgesamt vorliegende Metronidazolkonzentration sehr gering und würde die nicht vorhandene Wirksamkeit gegenüber adhärenenten, invasiven und freien Bakterien erklären.

Die Vorbehandlung der Bakterien mit Metronidazol in den gewählten Konzentrationen führte innerhalb einer Stunde nicht zu einem Abtöten aller Bakterien, bevor diese nach dem Entfernen des Metronidazols auf die Zellen gegeben wurden. Dies war auch nicht das unmittelbare Ziel dieses Versuches, sondern es sollte ermittelt werden, in welcher Form die

Vorbehandlung der Bakterien ihre Fähigkeiten der Adhärenz oder Invasion an KB-Zellen beeinträchtigt. 6 h nach Infektion der Zellen wurden bei der Sulkuskonzentration ( $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) weniger adhärente, invasive und freie Bakterien gemessen. Möglicherweise führt die Vorbehandlung von *P. gingivalis* mit Metronidazol in hohen Konzentrationen zu einer zeitweisen Beeinträchtigung seiner Replikationsfähigkeit. Ein Einfluss speziell auf die Fähigkeit des Bakteriums, an KB-Zellen zu adhären und sie zu penetrieren, konnte dabei jedoch nicht konstatiert werden.

Bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion wurden ebenfalls bei der Konzentration von  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  weniger adhärente Bakterien nach 6 und 18 h sowie weniger invasive Bakterien nach 1 und 6 h detektiert. Während bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol auch die Zahl der freien Bakterien nach 6 h leicht sank, konnte dies bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion nicht festgestellt werden. Die zeitgleiche Infektion und Zugabe des Metronidazols zu den Zellen führte eher zu einer Reduktion adhärenter und invasiver Bakterien als zu einer Verminderung der Anzahl der freien Bakterien.

Insbesondere die Ergebnisse dieses Versuches geben Anlass zu der schon erwähnten Vermutung, dass Metronidazol in sehr hohen Konzentrationen auf *P. gingivalis* bei der Interaktion mit KB-Zellen wirkt. Indirekt konnten wir mit unseren Versuchen diese Vermutung sogar für adhärente Bakterien bestätigen, denn bei allen drei Versuchen haben wir nach der 18-stündigen Infektion der Zellen für die Anzucht der invasiven Bakterien einen sogenannten “standard antibiotic protection assay” in abgewandelter Form mit Metronidazol durchgeführt (Tang et al. 1993, Sandros et al. 1994). Dazu haben wir Zellen und Bakterien eine Stunde lang Metronidazol in einer Konzentration von  $50\text{ mg/ml}$  inkubiert, um die adhärenen Bakterien zu eliminieren. Kontrollen bestätigten, dass nach dieser Behandlung keine adhärenen Bakterien nachweisbar waren. Die hierbei verwendete Konzentration von  $50\text{ mg/ml}$  ist jedoch für die klinische Anwendung irrelevant, da eine solche Konzentration in der Sulkusflüssigkeit oder im Serum nicht durch Applikation üblicher Dosierungen von Metronidazol erreicht werden kann.

Bei Betrachtung aller Ergebnisse ist die Wirksamkeit des Metronidazols gegenüber *P. gingivalis* ATCC 33277 in den getesteten Konzentrationen insgesamt als gering einzuschätzen. Die erzielten Ergebnisse bei den Versuchen mit *P. gingivalis* hatten wir in diesem Ausmaß

nicht erwartet, da wir im Vorfeld der Versuche eine MHK von  $0,125 \mu\text{g/ml}$  ermittelten und sich das Bakterium somit sensibel gegenüber dem Metronidazol zeigte. Außerdem zählt *P. gingivalis* zu den streng anaeroben Bakterien und gehört somit zum Wirkungsspektrum von Metronidazol. Es zeigte sich jedoch nur eine Wirksamkeit auf adhärente Bakterien bei der Durchführung des “standard antibiotic protection assays” mit Metronidazol in sehr hohen, klinisch nicht angewendeten Konzentrationen.

Die Ergebnisse einer In-vitro-Studie, bei der die Wirksamkeit verschiedener Antibiotika innerhalb von Single-Spezies-Biofilmen mit künstlichem Speichel getestet wurden, zeigten ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wirkung von Metronidazol gegenüber *P. gingivalis* (Eick et al. 2004). In der genannten Arbeit konnte *P. gingivalis* erst bei einer 100-fachen MHK nicht mehr detektiert werden. Auch für die anderen verwendeten Antibiotika war die MHK für die Abtötung der Bakterien im Biofilm nicht ausreichend. Dies wurde von den Autoren darauf zurückgeführt, dass die Schichten des Biofilms für die Antibiotika Barrieren darstellen und somit erst mit Konzentrationen oberhalb der MHK eine Wirkung erzielt werden kann.

Während die in unseren Versuchen angewendete Serumkonzentration ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) ungefähr der 100-fachen MHK entsprach ( $\text{MHK} = 0,125 \mu\text{g/ml}$ , 100-fache MHK =  $12,5 \mu\text{g/ml}$ ), war die Sulkuskonzentration etwa zehnfach höher als die 100-fache MHK. Trotz der Verwendung höherer Metronidazolkonzentrationen konnten wir im Gegensatz zu der Studie von Eick et al. (2004) keine Eliminierung von *P. gingivalis* erreichen. Im Unterschied zur genannten Studie, die mit künstlichem Speichel durchgeführt wurde, haben wir unsere Versuche an einer einschichtigen Epithelzellschicht durchgeführt, wobei die getesteten Bakterien über die Fähigkeit verfügen, an diese Zellen zu adhären. Es ist durchaus möglich, dass die Bakterien sich ähnlich wie in einem Biofilm auch an den Zellen in mehrschichtigen Komplexen organisieren und dadurch die Wirksamkeit des Antibiotikums herabgesetzt wird. Dies könnte die kaum vorhandene Wirkung von Metronidazol auf die adhärenen Bakterien erklären. Für die Erläuterung der Unwirksamkeit des Antibiotikums gegenüber den invasiven und freien Bakterien ist diese Überlegung jedoch nicht ausreichend.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Effektivität von Antibiotika gegenüber parodontopathogenen Bakterien in Epithelzellen (Eick und Pfister 2004), dabei wurde die Wirksamkeit von Metronidazol auf *P. gingivalis* ATCC 33277 in KB-Zellen untersucht. Auch bei

dieser Studie wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt des Metronidazols nachgewiesen. Eine Elimination von *P. gingivalis* ATCC 33277 wurde auch bei der höchsten getesteten Konzentration, die der 100-fachen MHK entsprach, nicht erreicht. Es zeigte sich außerdem, dass der antibakterielle Effekt des Metronidazols nach 2 und 4 h, jedoch nicht nach 12 h auftrat.

Unsere Untersuchungen haben zu ähnlichen Ergebnissen geführt. Während bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol kein Effekt auf die invasiven Bakterien festgestellt wurde, konnte eine geringfügige Reduktion der invasiven Bakterien von *P. gingivalis* ATCC 33277 bei hohen Metronidazolkonzentrationen bei der Vorinkubation der Bakterien nach 6 h sowie bei Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen nach 1 und 6 h festgestellt werden. Alle drei Versuche führten nach 18 h jedoch nicht zu einer geringeren Bakterienzahl.

Eick und Pfister (2004) beobachteten bei ihren Untersuchungen außerdem, dass sich der Phänotyp von *P. gingivalis* nach dem Eintritt in die Epithelzelle verändert. Im Vergleich zu extrazellulären Bakterien bildeten die intrazellulären Bakterien kleinere Kolonien aus und produzierten weniger Schleimsubstanzen. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Variation des Phänotyps eine mögliche Ursache für die Ineffektivität des Antibiotikums auf intrazelluläre Bakterien sein könnte. Nach Meinung der Autoren könnte eine mögliche Ursache für die nach 12 h festgestellte geringe Wirkung des Metronidazols im Vergleich zu den untersuchten Zeitpunkten 2 und 4 h ein Absinken der intrazellulären Metronidazolkonzentration infolge von Herausschwemmen des Antibiotikums aus der Zelle sein. Auf Grund dessen könnten sich noch in der Zelle befindende Bakterien wieder vervielfachen. Es ist fraglich, ob es wirklich zu einem Absinken der intrazellulären Metronidazolkonzentration kommt, da in pharmakokinetischen Studien nachgewiesen wurde, dass sich Metronidazol zwar nicht in eukaryotischen Zellen anreichert, aber seine intrazelluläre Konzentration der extrazellulären entspricht (Hand et al. 1987). Demnach wäre eine Abnahme der intrazellulären Metronidazolkonzentration nur bei gleichzeitiger Verminderung der extrazellulären Konzentration wahrscheinlich. Ob es bei den Versuchen zu einer zeitabhängigen Abnahme der Metronidazolkonzentration kam, wurde nicht untersucht.

Wie bereits erwähnt wurde, hat Metronidazol selbst keine antibakterielle Wirkung. Erst die Transformation seiner Nitrogruppe durch Nitroreduktasen der Mikroorganismen führt zu seiner antibakteriell wirksamen Form (Leiros et al. 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass

bisher nicht näher bekannte Interaktionen der Zellen mit den Bakterien oder auch Interaktionen der Zellen mit dem Metronidazol dazu geführt haben, dass die Umwandlung der Nitrogruppe nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß erfolgte und sich so die kaum vorhandene Wirksamkeit des Metronidazols, die bei adhären und freien Bakterien ermittelt wurde, erklären lässt. Unter Umständen ließe sich mit dieser Theorie auch die kaum vorhandene Wirkung auf invasive Formen von *P. gingivalis* erklären. Dabei ist durchaus denkbar, dass die Zellen infolge der Inkubation mit dem Metronidazol oder der Infektion mit *P. gingivalis* Substanzen produzieren und freisetzen, die zur Hemmung der bakteriellen Nitroreduktasen führen. In der Folge würde keine antibakteriell wirksame Form des Metronidazols entstehen und die ausbleibende Wirkung wäre damit erklärbar. Da die Produktion zellulärer Substanzen von vielen Faktoren abhängig ist und stimuliert bzw. inhibiert werden kann, könnte eine dosisabhängige Induktion dieser Substanzen diskutiert werden. Damit ließe sich auch erklären, warum sehr hohe Metronidazolkonzentrationen zu einer Abtötung adhären und freier Bakterien von *P. gingivalis* führen. Dies wären mögliche Ziele für weiterführende Untersuchungen.

Wir konnten bei unseren Versuchen mit *A. actinomycetemcomitans* keine Eliminierung des Bakteriums erreichen. Die kaum vorhandene Wirkung von Metronidazol auf *A. actinomycetemcomitans* entsprach durchaus unseren Erwartungen, da wir keine minimale Hemmkonzentration für dieses Bakterium im E-Test ermitteln konnten. Da es sich bei *A. actinomycetemcomitans* um ein mikroaerophiles Bakterium handelt, steht die beobachtete Resistenz in guter Übereinstimmung mit dem festgestellten anaeroben Wirkungsspektrum des Metronidazols (Chow et al. 1977). Auch in anderen In-vitro-Studien wurden ähnliche Ergebnisse erzielt und viele Stämme von *A. actinomycetemcomitans* erwiesen sich als resistent gegenüber Metronidazol (Eick et al. 2004, Mueller et al. 2002).

Die Versuche mit *A. actinomycetemcomitans* haben wir trotz der zuvor ermittelten Resistenz durchgeführt, weil wir nicht nur die Kolonie bildenden Einheiten der Bakterien, sondern auch den Einfluss sowohl der Bakterien als auch des Metronidazols auf die Interleukinbildung der Zellen untersuchen wollten.

Bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol kam es unter Einfluss von Metronidazol zu einer konzentrationsabhängigen, geringen Reduktion adhären und invasiver Bakterien nach 1 h sowie bei den invasiven Bakterien nach 18 h. Dies steht im Gegensatz



zu den Ergebnissen bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol und bei der Zugabe des Metronidazols bei Infektion der Zellen sowie zur festgestellten Resistenz von *A. actinomycetemcomitans* gegenüber Metronidazol.

Die Messungen für die adhärenenten und invasiven Bakterien nach 1 h sowie für die invasiven Bakterien nach 18 h bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol geben ein Indiz für eine mögliche Reduzierung von *A. actinomycetemcomitans*. Da abgesehen von diesen Teilergebnissen keine Wirksamkeit des Metronidazols festgestellt wurde, lassen sich die Ergebnisse insgesamt so interpretieren, dass Metronidazol keine oder nur eine sehr geringe Wirkung auf *A. actinomycetemcomitans* entfaltet. Für eine endgültige Aussage ist eine größere Statistik basierend auf einer größeren Anzahl von Einzelversuchen notwendig.

Bei den Ergebnissen treten im Hinblick auf die Zahl der Bakterien nur geringfügige Unterschiede für die drei verschiedenen Versuchstypen auf: Die Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol führte nicht zu einer deutlichen Reduktion der Bakterienzahlen. Mögliche antibakterielle Effekte traten wie bereits erwähnt nach 1 h bei den adhärenenten und invasiven Bakterien und nach 18 h bei den invasiven Bakterien auf. Eine eindeutige Wirkung war jedoch nicht zu verzeichnen. Somit trägt die Vorbehandlung der Zellen nicht zur Reduzierung von *A. actinomycetemcomitans* bei und gewährt den Zellen keinen Schutz vor adhärenenten oder eindringenden Bakterien. Die Vorinkubation von *A. actinomycetemcomitans* mit Metronidazol führte auch nicht wie erwünscht zu einer Reduzierung seiner Kolonie bildenden Einheiten. Bei diesem Versuch waren sowohl bei den adhärenenten und invasiven als auch bei den freien Bakterien nach 18 h deutlich erhöhte KBE im Vergleich zu den Kontrollwerten aufgetreten. Möglicherweise fördert die Vorbehandlung der Bakterien mit Metronidazol das Wachstum von *A. actinomycetemcomitans*. Auch bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion konnte nicht die gewünschte Wirkung auf *A. actinomycetemcomitans* festgestellt werden.

Die in vielen In-vitro-Studien erzielten Ergebnisse in Bezug auf die Wirksamkeit von Metronidazol auf *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* werden zum Teil durch Resultate klinischer Studien unterstützt. Jedoch gibt es hierbei eine viel breitere Ergebnisstreuung als bei In-vitro-Studien. Die Gründe für diese Varianz sind in unterschiedlichem Studiendesign und -auswertung zu finden. Die nachfolgend betrachteten Studien soll einen kleinen Überblick über klinische Arbeiten über die Wirksamkeit von Metronidazol geben.

In einer klinischen Studie wurde die Wirksamkeit von drei verschiedenen lokal applizierten Antibiotika bei Patienten mit persistierenden Taschen über 5 mm nach Wurzeldebridement und -glättung getestet (Kinane und Radvar 1999). Während in der Kontrollgruppe nur die mechanische Bearbeitung der Wurzeloberflächen wiederholt wurde, kamen in den anderen Gruppen additiv 25%-iges Metronidazolgel, 25%-ige Tetracyclinfasern oder 2%-iges Minocyclingel zur Anwendung. Die Messung klinischer Parameter erfolgte vor Beginn der Behandlung sowie 6 Wochen, 3 und 6 Monate nach Gabe der Antibiotika. In allen vier Gruppen konnten statistisch signifikante Verbesserungen bei Taschentiefe, Attachmentlevel, Blutung bei Sondierung und dem modifizierten gingivalen Index erreicht werden, wobei die Ergebnisse bei der Gabe von Antibiotika stets besser als bei Kürettage der Wurzeln allein waren. Bei allen klinisch untersuchten Parametern erzielte Tetrazyklin die besten Ergebnisse, wobei nicht in jedem Fall eine statistische Signifikanz aufzuweisen war. Es erfolgte jedoch keine mikrobiologische Diagnostik, die eine Erradikation parodontopathogener Bakterien durch die Antibiotika bzw. deren Vorhandensein vor Beginn der Therapie hätte nachweisen können. Damit wäre eine genauere Aussage über die Wirksamkeit der verwendeten Antibiotika möglich gewesen.

Eine weitere klinische Studie beschäftigte sich mit der lokalen antimikrobiellen Therapie nach mikrobiologisch erfolgter Diagnostik (Mombelli et al. 2002). Die Studie wurde an 17 Patienten mit fortgeschrittener Parodontitis nach Standardtherapie durchgeführt, wenn *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis* in den Taschen der Patienten detektiert wurde. Positiv getestete Taschen wurden mit Tetracyclin getränkten Fäden (Actisite) 7-10 Tage lang behandelt. Einen Monat später wurden wieder bei allen Patienten mikrobiologische Screenings durchgeführt. Bei allen immer noch oder neu infizierten Taschen mit *P. gingivalis* oder *A. actinomycetemcomitans* wurden erneut Actisite-Fäden für 7-10 Tage appliziert. Wiederum nach einem Monat erfolgte eine erneute Diagnostik. Patienten, bei denen zu diesem Zeitpunkt Infektionen mit *P. gingivalis* oder *A. actinomycetemcomitans* ermittelt wurden, erhielten anschließend eine systemische Antibiotikatherapie mit 3 x 250 mg Metronidazol und 3 x 375 mg Amoxicillin für den Zeitraum einer Woche. Alle Patienten wurden jeweils 3 und 6 Monate nach ihrer letzten antibiotischen Behandlung mikrobiologisch auf die Anwesenheit der Zielbakterien getestet. Die Anzahl der nachweislich infizierten Taschen wurde durch die lokale Applikation von mit Tetracyclin getränkten Fäden deutlich reduziert, eine

vollständige Eliminierung gelang jedoch weder bei *A. actinomycetemcomitans* noch bei *P. gingivalis*. Dieses Ziel wurde auch nicht nach Wiederholung der Tetrazyklintherapie noch nach danach erfolgter systemischer Kombinationstherapie mit Metronidazol und Amoxicillin erreicht. Nach abgeschlossener Therapie konnten bei 5 Personen *P. gingivalis* und bei 4 Patienten *A. actinomycetemcomitans* detektiert werden. Diese Studie zeigt die Schwierigkeit der antibiotischen Eliminierung der beiden genannten parodontopathogenen Bakterien.

### **6.3 Beeinflussung der Freisetzung von Zytokinen aus KB-Zellen durch Metronidazol und die Bakterien**

#### **Einfluss des Metronidazols und der Bakterien auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$**

Bei unseren Versuchen konnten wir nicht feststellen, dass die Infektion der KB-Zellen mit *P. gingivalis* bzw. *A. actinomycetemcomitans* oder die Inkubation der Zellen mit Metronidazol zu einer Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-6 oder TNF- $\alpha$  führte.

Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die durch *P. gingivalis* induzierte Freisetzung von IL-6 aus KB-Zellen wurden auch in einer In-vitro-Studie gefunden, bei der KB-Zellen mit verschiedenen Stämmen von *P. gingivalis* infiziert wurden (Eick et al. 2002). Neben Stämmen aus klinischen Isolaten diente *P. gingivalis* ATCC 33277 als Referenzstamm. Zwar konnten dabei minimale Konzentrationen von IL-6 nachgewiesen werden (maximal 6 pg/ml), jedoch konnten diese IL-Konzentrationen auch bei unstimulierten Zellen festgestellt werden. Als Vergleich wurde auch die Induzierung der IL-6-Produktion durch *A. actinomycetemcomitans* Y4 untersucht. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurden hierbei IL-6-Konzentrationen bis zu 60,8 pg/ml detektiert.

Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass bei der Infektion von KB-Zellen mit *P. gingivalis* mRNA der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  gebildet wird (Sandros et al. 2000). Weiterführend wurde auch untersucht, ob es zur Translation der mRNA und somit zur Bildung der Proteine kommt. Dabei konnte mit immunhistochemischen Methoden gezeigt werden, dass die Zellen IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  produzieren. Möglicherweise können die differenten Ergebnisse durch die Verschiedenartigkeit der beiden Untersuchungsmethoden erklärt werden. Das bei der vorliegenden Arbeit verwendete ELISA-Verfahren ermöglicht

vor allem die Untersuchung der Quantität der gesuchten Proteine bei einer Nachweisgrenze von ca. 2 pg/ml. Dagegen können bei der immunhistochemischen Methode geringste Mengen eines Proteins über fluoreszierende Farbstoffe sichtbar gemacht werden. Ein weiterer Unterschied der beiden Nachweismethoden besteht darin, dass bei dem immunhistochemischen Verfahren die gesuchten Proteine direkt an den Zellen untersucht werden, während bei dem ELISA-Verfahren die Proteine aus dem Zellüberstand detektiert werden. Proteine, die möglicherweise an der Zelloberfläche haften, können zwar über immunhistochemische Verfahren, jedoch nicht mit dem ELISA-Test nachgewiesen werden. Zusammenfassend können zwei mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden, die den Nachweis der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  mit dem immunhistochemischen Verfahren und die Negativergebnisse des ELISA-Testes erklären: Erstens könnte es sein, dass die Menge der gebildeten Zytokine sehr gering ist. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass die Zytokine nicht in den Zellüberstand abgegeben werden und eventuell an der Zelloberfläche verbleiben.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen an KB-Zellen fanden Uchida et al. (2001) heraus, dass die Infektion von humanen gingivalen Epithelzellen mit *A. actinomycetemcomitans* zur Bildung von mRNA von IL-1 $\beta$  führt, IL-1 $\beta$  konnte jedoch nicht detektiert werden. Weder mRNA von IL-6 noch das Zytokin selbst konnten in dieser Studie nachgewiesen werden.

Untersuchungen, ob Metronidazol die Freisetzung von Zytokinen aus KB-Zellen beeinflusst, wurden bisher nicht durchgeführt und können daher nicht vergleichend bewertet werden.

### **Einfluss des Metronidazols und der Bakterien auf die Freisetzung von Interleukin-8**

Die Auswertung unserer Ergebnisse deutet darauf hin, dass Metronidazol in Abhängigkeit der Konzentration die Freisetzung von IL-8 aus nicht infizierten KB-Zellen fördert. Während nach 1 h bei allen drei Versuchstypen fast kein IL-8 detektiert werden konnte, steigen die IL-8-Werte nach 6 und 18 h an. Dabei korrelieren bei den Kontrollversuchen ohne Bakterien hohe IL-8-Werte mit hohen Metronidazolkonzentrationen, allerdings konnte keine direkte proportionale Abhängigkeit der IL-8-Werte zur Metronidazolkonzentration festgestellt werden. Studien, die den Einfluss von Metronidazol auf die Stimulierung der IL-8-Bildung bei KB-Zellen untersuchen, wurden bisher nicht durchgeführt und können daher nicht zum Ver-

gleich unserer Ergebnisse herangezogen werden.

Bei der Infektion der Zellen mit *P. gingivalis* konnten wir nur bei einer einzigen Messung IL-8 detektieren (Zugabe bei Infektion, 6 h, 100 µg Metronidazol pro ml). Alle anderen ausgewerteten Proben unserer Versuche wiesen keine messbare IL-8 Konzentration auf.

In Bezug auf die durch *P. gingivalis* induzierte Freisetzung von IL-8 aus KB-Zellen weichen unsere Ergebnisse von denen einer weiteren In-vitro-Studie ab (Eick et al. 2002). Dabei wurden nach 6 h 105 pg/ml sowie nach 24 h 126 pg/ml nachgewiesen, wobei beide Werte dem Bereich der unstimulierten KB-Zellen entsprachen. Die bei beiden Studien differierenden Ergebnisse erklären sich durch die Verwendung verschiedener Medien bei der Infektion der Zellen. Während bei unserem Versuch EMEM ohne Zusatz verwendet wurde, wurde in der Studie von Eick et al. (2002) EMEM mit FCS verwendet, wobei der Zusatz die Vitalität der Zellen bei längeren Versuchen erhält. FCS führt wahrscheinlich über das darin enthaltene Albumin zu einer Stimulierung der IL-8 Freisetzung bei den KB-Zellen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Werte der unstimulierten KB-Zellen im gleichen Bereich liegen wie die Werte der mit *P. gingivalis* infizierten Zellen.

Auch in einer anderen Studie wurden bei mit *P. gingivalis* infizierten KB-Zellen nur sehr niedrige Level von IL-8 gemessen (Zhang et al. 1999). Bei diesen Versuchen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Zellen weiterhin mRNA von IL-8 exprimieren. Die Menge der mRNA der infizierten Zellen war im Vergleich zu nicht infizierten KB-Zellen sogar größer, woraus sich schließen lässt, dass *P. gingivalis* die Bildung von IL-8 induziert. Weiterführend wurde die Wirkung eines Proteasenhemmers (N- $\alpha$ -toxyl-L-lysine chloromethylketone (TLCK)) in Bezug auf die Konzentration des IL-8 untersucht: Die Zugabe von *P. gingivalis* zu IL-8 führte nach 30 min zu einer Abnahme der IL-8 Konzentration um 90%, jedoch konnte bei zusätzlicher Gabe des Proteasenhemmers die Ausgangskonzentration des IL-8 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass IL-8 von den KB-Zellen gebildet und von den *P. gingivalis*-Proteasen abgebaut wird.

Da wir bei den Versuchen mit *P. gingivalis* und Metronidazol nur bei einer einzigen Messung IL-8 detektieren konnten, lässt sich daraus schlussfolgern, dass Metronidazol wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Abbau des IL-8 durch *P. gingivalis* ausübt, auch nicht indirekt durch antimikrobielle Wirkung auf das Bakterium selbst.

Möglicherweise kann man mit einer Theorie der doppelten Induzierung der IL-8-Freisetzung unseren Messwert von 122 pg IL-8 je ml (Zugabe bei Infektion, 6 h, Metronidazolkonzentration 100 µg/ml) erklären. Ein Nachweis, dass *P. gingivalis* die Freisetzung von IL-8 stimuliert, wurde bereits erbracht, ebenso, dass die Proteasen von *P. gingivalis* IL-8 abbauen (Zhang et al. 1999). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch Metronidazol KB-Zellen zur Produktion von IL-8 anregt. Es ist also möglich, dass bei der gleichzeitigen Zugabe von hohen Konzentrationen des Metronidazols als auch von *P. gingivalis* zu KB-Zellen diese mehr IL-8 bilden, als durch die Proteasen von *P. gingivalis* abgebaut werden kann. Für diese Theorie spricht, dass bei den anderen Versuchstypen, bei denen Metronidazol und *P. gingivalis* nicht gleichzeitig auf die Zellen gegeben werden, kein IL-8 detektierbar war. Diese These wird allerdings nicht durch einen weiteren positiven Messwert nach 18 h desselben Versuches gestützt, so dass auf der Basis der vorliegenden Messresultate in dieser Frage eine Unsicherheit bestehen bleibt. Weitere Versuche mit noch höheren Metronidazolkonzentrationen sind zur Klärung dieser These notwendig.

Sandros et al. (2000) erbrachten mittels In-situ-Hybridisierung den Nachweis, dass sowohl bei KB-Zellen als auch bei primären Taschenepithelzellen nach einer Infektion mit *P. gingivalis* mRNA von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  vorhanden war. Verschiedene Stämme von *P. gingivalis* sowie *E. coli* wurden untersucht, um zu klären, ob die Zytokinausschüttung der Zellen durch die Invasion der Bakterien getriggert wird. Als Gegenprobe wurden hitzebehandelte Bakterien verwendet, die die Zellen nicht mehr penetrieren können. Die Zytokinausschüttung der Zellen war proportional zur Adhärenz bzw. Invasivität der Bakterien. Es stellte sich heraus, dass der nicht invasive Stamm von *E. coli* eine ähnliche Zytokinproduktion der Zellen anregt wie der am stärksten invasive Stamm von *P. gingivalis*. Auch konnte die gleiche Interleukinbildung der Zellen bei der Behandlung der Zellen mit dem hitzebehandelten avitalen Stamm von *P. gingivalis* beobachtet werden. Die Ergebnisse widerlegen also die These, dass die Zytokinausschüttung in den Invasionsprozess involviert ist. Die Autoren vermuten, dass der Vorgang der Adhärenz dabei eine Rolle spielen könnte.

Weitergehende Untersuchungen ermöglichten noch detailliertere Aussagen über die Kinetik der IL-8-Regulation bei Epithelzellen durch *P. gingivalis* (Huang et al. 2001). Die Testung verschiedener Stämme von *P. gingivalis* wurde an HOK-18A- und HOK-16B-BaP-T1-Zellen, immortalisierten Zelllinien oraler Keratinozyten, durchgeführt. ELISA-Tests zeigten

ein Absinken der IL-8 Konzentration bei mit *P. gingivalis* 381 und ATCC 33277 infizierten Zellen nach 2 h, wobei ein Minimum nach 18 h erreicht wurde. Die bis zu 30 h aufgenommenen Messwerte zeigten keine weiteren Veränderungen. Die in dieser Studie ermittelte Abnahme der IL-8 Konzentration in einem Zeitraum von bis zu 10 h nach Infektion der Zellen mit *P. gingivalis* konnten wir bei unseren Ergebnissen nicht feststellen, da wir ohne Metronidazolzugabe IL-8 zu keinem untersuchten Zeitpunkt detektieren konnten. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf die Verwendung verschiedener Zelllinien zurückzuführen. Trotz der Varianz ist für beide Studien eine gemeinsame Interpretation der Ergebnisse in der Hinsicht möglich, dass *P. gingivalis* möglicherweise die Freisetzung von IL-8 aus Epithelzellen blockiert.

Um herauszufinden, durch welche Eigenschaft von *P. gingivalis* die Bildung von IL-8 beeinflusst wird, wurden von Huang et al. (2001) verschiedene Stämme von *P. gingivalis* untersucht. Die wenig invasiven Stämme W 50 und W 83 bewirkten keine Verminderung der IL-8-Bildung. Die Vorbehandlung der stark invasiven Stämme 381 und ATCC 33277 mit Natriumazid, einem Invasionsinhibitor, führte ebenfalls nicht zu einer Abnahme der durch diese Bakterien induzierten IL-8-Konzentration. Diese Ergebnisse unterstützen die Ergebnisse der oben genannten Studie von Sandros et al. (2000), in der gezeigt werden konnte, dass der Invasionsprozess keinen Einfluss auf die Bildung von IL-8 ausübt.

Huang et al. (2001) testeten außerdem mittels einer Northern-Blot-Analyse mRNA von Zellen, die mit *P. gingivalis* infiziert wurden. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der mRNA-Konzentration 2-4 h nach Infektion der Zellen mit *P. gingivalis*. Die danach gemessenen Werte waren geringer als bei nicht infizierten Zellen. Unterschiede in Bezug auf die mRNA-Konzentrationen in Abhängigkeit verschiedener Stämme ließen sich nicht aufzeigen. Alle Versuche der Studie von Huang et al. (2001) wurden mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen durchgeführt, wobei die ermittelten mRNA- und IL-8-Werte sich proportional zur bakteriellen Dosis verhielten. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Regulation von IL-8 von der Quantität der Bakterien beeinflusst wird.

Die stärkste Freisetzung von IL-8 erfolgte bei unseren Versuchen mit *A. actinomycetem-comitans*, wobei auch hier die Konzentration des Metronidazols einen Einfluss auf die Freisetzung von IL-8 hatte. Die Werte sind im Vergleich zu den Kontrollversuchen ohne Bakterien deutlich erhöht. Während sowohl bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol und

auch bei Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen nach 6 h noch moderate Anstiege innerhalb der Metronidazolkonzentration gemessen werden konnten, stiegen die IL-8-Werte in Abhängigkeit der Metronidazolkonzentration bei allen Versuchen nach 18 h stark an. Es konnte also gezeigt werden, dass die Interleukinfreisetzung, die durch *A. actinomycetemcomitans* bei KB-Zellen induziert wurde, zeitabhängig ansteigt.

Unsere Ergebnisse in Bezug auf die IL-8-Stimulierung durch *A. actinomycetemcomitans* stimmen mit den Resultaten einer Arbeit überein, bei der der Mechanismus der durch *A. actinomycetemcomitans* induzierten Freisetzung aus epithelialen Zellen untersucht wurde (Sfakianakis et al. 2001). Zusätzlich zur zeitabhängigen Förderung der IL-8 Freisetzung aus PP-Zellen, einer immortalisierten gingivalen Epithelzelllinie, wurde eine dosisabhängige Induzierung durch *A. actinomycetemcomitans* festgestellt. Dabei trat die größte IL-Stimulierung bei den Zellen auf, die mit einer Suspension von 50  $\mu\text{g/ml}$  *A. actinomycetemcomitans* infiziert wurden. Höhere Konzentrationen von *A. actinomycetemcomitans* führten infolge der Beeinträchtigung der Zellvitalität durch *A. actinomycetemcomitans* vermittelte Zytotoxizität zu einer geringeren IL-8-Bildung. Des Weiteren wurde in der Studie nachgewiesen, dass das LPS von *A. actinomycetemcomitans* keinen Einfluss auf die Induzierung der IL-8-Freisetzung aus den gingivalen Epithelzellen hat. Festgestellt wurde außerdem, dass die p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) in den Prozess der durch *A. actinomycetemcomitans* vermittelten IL-Bildung eingreift. P38-MAPK gehört zur Familie der Zellsignalmoleküle, die durch extrazelluläre Stimuli aktiviert werden, Signale von der Zelloberfläche zum Zellkern transportieren und an der Regulierung der Genexpression beteiligt sind.

Die durch Metronidazol und *A. actinomycetemcomitans* hervorgerufenen erhöhten IL-8-Konzentrationen tragen zur Initiierung der ersten Phase der Immunantwort bei. Der Abbau des IL-8 durch die Proteasen des *P. gingivalis* schützen dieses Bakterium vor der Phagozytose durch PMNs. Diese Fähigkeit stellt somit einen wichtigen Virulenzfaktor dieses Bakteriums dar.

### **Einfluss des Metronidazols und der Bakterien auf die Freisetzung von TGF- $\beta_1$ aus KB-Zellen**

Unsere Versuche haben gezeigt, dass bei einstündiger Wirkung von Metronidazol auf KB-Zellen eine konzentrationsabhängige TGF- $\beta_1$ -Freisetzung induziert wird, dieser Effekt



bei 6- und 18-stündiger Inkubation jedoch nicht festzustellen war. Metronidazol scheint also kurzfristig in Abhängigkeit von seiner Konzentration KB-Zellen zur Freisetzung von TGF- $\beta_1$  anzuregen, eine langfristige Induktion erfolgt jedoch nicht. Der Einfluss von Metronidazol auf die Freisetzung von TGF- $\beta_1$  aus KB- bzw. Epithelzellen wurde bisher noch nicht in anderen Studien untersucht. Eine vergleichende Diskussion ist aus diesem Grund nicht möglich.

Ein eindeutig interpretierbarer Einfluss von *P. gingivalis* in Bezug auf die TGF- $\beta_1$ -Freisetzung aus KB-Zellen ist auf Grund unserer Ergebnisse nicht möglich. Bei der Vorinkubation der Zellen und bei der Vorinkubation der Bakterien waren die durch *P. gingivalis* induzierten Werte von TGF- $\beta_1$  gegenüber den Kontrollwerten ohne Bakterien zu allen gemessenen Zeitpunkten erhöht. Eindeutige Steigerungen der Werte im Zusammenhang mit der Metronidazolkonzentration waren nicht erkennbar. Bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion waren die durch *P. gingivalis* beeinflussten Werte des TGF- $\beta$  lediglich zum Zeitpunkt von 18 h erhöht. Eine eindeutige Stimulation der TGF- $\beta$ -Freisetzung kann also nicht postuliert werden.

Auch bei den Versuchen, die wir mit *A. actinomycetemcomitans* durchgeführt haben, gibt es keine eindeutige Aussage über die Induktion der TGF- $\beta_1$ -Freisetzung aus KB-Zellen. Bei der Betrachtung aller Versuche konnte insgesamt nur zwei Mal beobachtet werden, dass die allein durch *A. actinomycetemcomitans* beeinflussten TGF- $\beta_1$ -Werte die Kontrollwerte wesentlich übersteigen: bei der Vorinkubation der Bakterien nach 1 h sowie bei der Zugabe des Metronidazols bei Infektion der Zellen nach 18 h. Ein zeitlicher oder versuchsbezogener Zusammenhang konnte dabei nicht festgestellt werden.

Die Freisetzung von TGF- $\beta_1$  aus KB- bzw. Epithelzellen im direkten Zusammenhang mit *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis* wurde in dieser Form bisher nicht untersucht. Eine In-vitro-Studie untersuchte die Freisetzung von verschiedenen Wachstumsfaktoren, darunter TGF- $\beta_1$ , aus humanen kultivierten Epithelzellproben, die von Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis gewonnen wurden (Momose et al. 2002). Eine erhöhte Freisetzung von TGF- $\beta_1$  konnte dabei detektiert werden. Dies korreliert mit den in unseren Untersuchungen detektierten erhöhten TGF- $\beta_1$  Konzentrationen.

## 7 Schlussfolgerungen

Die Interaktion zwischen Metronidazol und parodontopathogenen Bakterien im Zusammenhang mit KB-Zellen beeinflusst die antibakterielle Wirkung des Metronidazols. Selbst bei der höchsten getesteten Konzentration des Metronidazols von 100 µg/ml konnte weder bei *A. actinomycetemcomitans* noch bei dem sensibel getesteten *P. gingivalis* eine abtötende Wirkung auf freie, adhärente oder invasive Bakterien registriert werden. Dies unterstreicht möglicherweise klinische Ergebnisse, bei der die Wirksamkeit des Metronidazols nicht mit der getesteten Sensibilität der nachgewiesenen Bakterien übereinstimmt. Insbesondere durch die nicht vorhandene Wirkung bei invasiven Bakterien sollte die Verwendung von Metronidazol bei aggressiven oder schweren, chronischen Verläufen von Parodontitiden, die häufig mit der Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis* vergesellschaftet sind, kritisch betrachtet werden.

Sowohl Bakterien als auch Metronidazol sind in der Lage, die Freisetzung von Zytokinen aus epithelialen Zellen zu beeinflussen und somit eine Stimulation des Immunsystems hervorzurufen. So wird die Freisetzung von IL-8 von Metronidazol und auch von *A. actinomycetemcomitans* gefördert. Additive Effekte zeigten sich, wenn Metronidazol und *A. actinomycetemcomitans* auf die Zellen einwirkten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Immunsystem nicht nur durch Bakterien sondern auch durch Metronidazol stimuliert wird. Das proinflammatorische Zytokin IL-8 führt zur Aktivierung und Anlockung von PMNs an den Ort seiner Freisetzung. Die Funktion der PMNs besteht in der Beseitigung von Bakterien durch Phagozytose. Die durch *A. actinomycetemcomitans* bereits induzierte Stimulierung der Immunantwort wurde durch Zugabe von Metronidazol verstärkt. Bei Applikation hoher Metronidazolkonzentrationen konnte sogar im Einzelfall nach Infektion mit *P. gingivalis*, dessen Proteasen IL-8 abbauen, IL-8 nachgewiesen werden. In diesem Fall würde Metronidazol die von *P. gingivalis* unterdrückte unspezifische Abwehr aktivieren und einen wichtigen Virulenzfaktor von *P. gingivalis* außer Kraft setzen.

Bei der Untersuchung des TGF- $\beta_1$  konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Eine kurzzeitige Steigerung der Freisetzung nach Zugabe des Metronidazols konnte verzeichnet werden. Insgesamt ist die Rolle von TGF- $\beta_1$  im Rahmen von parodontalen Erkrankungen weiterhin unklar.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Interaktionen zwischen Metronidazol und parodontopathogenen Bakterien im Zusammenhang mit KB-Zellen die keimeliminiierende Wirkung des Medikaments stark beeinträchtigen und daher dessen Verwendung bei der Behandlung von aggressiven und schweren chronischen Parodontitiden kritisch zu bewerten ist. Weiterhin wird die Zytokinfreisetzung aus KB-Zellen von Metronidazol und parodontopathogenen Bakterien beeinflusst und somit möglicherweise das unspezifische Immunsystem aktiviert.

## A Anhang

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	17.295	786	157.224
	2,5	141.502	5.503	245.270
	10,0	249.987	5.110	433.940
	100,0	6.092	1.179	141.502
6	0,0	117.794	48.800	290.278
	2,5	218.760	107.697	302.899
	10,0	95.077	841	306.265
	100,0	69.414	0	249.050
18	0,0	87.933	75.652	100.215
	2,5	156.954	153.269	160.638
	10,0	122.321	106.601	138.041
	100,0	159.410	133.128	185.692

Tabelle 2: Medianwerte, Maxima und Minima der adhärennten Bakterien von *P. gingivalis* bei der Vorinkubation der Zellen

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	1.549	90	78.446
	2,5	1.049	0	6.987
	10,0	7.131	1.549	11.526
	100,0	13.326	540	33.568
6	0,0	26.570	1.093	50.450
	2,5	51.459	13.453	107.626
	10,0	12.024	252	33.633
	100,0	14.294	0	58.522
18	0,0	14.293	8.032	20.555
	2,5	17.921	4.145	31.696
	10,0	9.198	7.255	11.141
	100,0	13.019	9.198	16.841

Tabelle 3: Medianwerte, Maxima und Minima der invasiven Bakterien von *P. gingivalis* bei der Vorinkubation der Zellen

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
6	0,0	1.618.851	539.617	1.079.234
	2,5	1.275.459	833.954	441.505
	10,0	6.132	3.066	3.066
	100,0	36.792	6.132	30.660
18	0,0	223.500	201.516	21.984
	2,5	201.516	131.902	69.615
	10,0	186.861	183.197	3.664
	100,0	186.861	168.541	18.320

Tabelle 4: Medianwerte, Maxima und Minima der freien Bakterien von *P. gingivalis* bei der Vorinkubation der Zellen

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	48.150	32.694	63.606
	2,5	38.887	29.722	48.051
	10,0	44.286	34.676	53.896
	100,0	49.537	43.196	55.878
6	0,0	143.667	123.651	163.682
	2,5	114.311	113.866	114.755
	10,0	166.462	129.433	203.491
	100,0	66.985	54.798	79.172
18	0,0	87.933	58.622	117.244
	2,5	98.681	80.117	117.244
	10,0	128.236	124.572	131.900
	100,0	87.445	53.737	121.153

Tabelle 5: Medianwerte, Maxima und Minima der adhärennten Bakterien von *P. gingivalis* bei der Vorinkubation der Bakterien

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	20.408	18.141	22.676
	2,5	39.569	38.746	40.393
	10,0	41.573	41.573	41.573
	100,0	30.764	27.816	33.712
6	0,0	26.171	24.158	28.184
	2,5	22.145	20.131	24.158
	10,0	24.158	20.131	28.184
	100,0	16.105	16.105	16.105
18	0,0	14.293	10.787	17.799
	2,5	28.766	21.575	35.958
	10,0	64.725	53.937	75.512
	100,0	17.440	13.304	21.575

Tabelle 6: Medianwerte, Maxima und Minima der invasiven Bakterien von *P. gingivalis* bei der Vorinkubation der Bakterien

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
6	0,0	1.651.556	1.651.556	1.651.556
	2,5	336.917	307.189	366.645
	10,0	548.729	492.164	605.295
	100,0	221.308	211.399	231.218
18	0,0	223.500	181.707	265.293
	2,5	702.602	290.732	1.114.472
	10,0	2.107.805	1.259.837	2.955.772
	100,0	872.195	290.732	1.453.659

Tabelle 7: Medianwerte, Maxima und Minima der freien Bakterien von *P. gingivalis* bei der Vorinkubation der Bakterien

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	48.150	42.372	53.928
	2,5	76.215	68.786	83.643
	10,0	77.453	54.478	100.427
	100,0	64.383	62.182	66.585
6	0,0	143.667	130.146	157.187
	2,5	158.743	154.074	163.412
	10,0	174.306	130.730	217.883
	100,0	115.945	73.146	158.743
18	0,0	87.933	77.843	98.024
	2,5	103.790	85.050	122.530
	10,0	82.167	77.843	86.492
	100,0	57.121	42.165	72.077

Tabelle 8: Medianwerte, Maxima und Minima der adhärennten Bakterien von *P. gingivalis* bei der Zugabe der Bakterien zum Zeitpunkt der Infektion

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	20.408	19.773	21.044
	2,5	13.205	11.440	14.971
	10,0	10.663	4.661	16.666
	100,0	8.730	5.155	12.305
6	0,0	26.171	20.534	31.808
	2,5	32.839	31.455	34.223
	10,0	19.729	14.092	25.366
	100,0	16.332	12.884	19.779
18	0,0	14.293	12.994	15.593
	2,5	17.325	15.939	18.711
	10,0	12.561	1.733	23.389
	100,0	17.758	17.325	18.192

Tabelle 9: Medianwerte, Maxima und Minima der invasiven Bakterien von *P. gingivalis* bei der Zugabe der Bakterien zum Zeitpunkt der Infektion

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
6	0,0	1.651.556	1.302.188	2.000.923
	2,5	1.429.231	1.333.949	1.524.513
	10,0	1.381.590	1.111.624	1.651.556
	100,0	1.206.906	1.206.906	1.206.906
18	0,0	223.500	214.264	232.736
	2,5	196.717	184.711	208.723
	10,0	259.057	74.808	443.306
	100,0	374.963	232.736	517.190

Tabelle 10: Medianwerte, Maxima und Minima der freien Bakterien von *P. gingivalis* bei der Zugabe der Bakterien zum Zeitpunkt der Infektion

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	70.658	19.795	175.956
	2,5	64.884	17.046	159.461
	10,0	37.803	16.221	78.081
	100,0	19.245	9.348	20.895
6	0,0	152.155	92.733	308.423
	2,5	140.847	61.685	205.615
	10,0	186.082	87.901	308.423
	100,0	118.229	48.834	257.019
18	0,0	113.633	58.684	168.583
	2,5	208.061	137.640	278.482
	10,0	139.774	87.492	192.056
	100,0	201.126	76.823	325.429

Tabelle 11: Medianwerte, Maxima und Minima der adhärennten Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Vorinkubation der Zellen

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	12.496	3.662	17.222
	2,5	9.947	3.464	15.837
	10,0	7.003	3.365	10.393
	100,0	2.771	1.039	5.345
6	0,0	25.113	0	60.091
	2,5	25.038	0	60.091
	10,0	39.560	0	60.091
	100,0	50.076	25.158	66.400
18	0,0	12.033	8.955	15.112
	2,5	17.175	6.996	27.355
	10,0	7.101	2.449	11.753
	100,0	4.338	2.728	5.947

Tabelle 12: Medianwerte, Maxima und Minima der invasiven Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Vorinkubation der Zellen

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
6	0,0	443.717	20.504	811.729
	2,5	414.276	201.881	702.377
	10,0	261.814	75.705	521.525
	100,0	437.408	119.867	883.228
18	0,0	182.667	147.148	218.185
	2,5	362.796	197.889	527.704
	10,0	253.704	101.481	405.926
	100,0	563.222	329.815	796.630

Tabelle 13: Medianwerte, Maxima und Minima der freien Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Vorinkubation der Zellen

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	84.267	50.952	117.581
	2,5	59.117	58.137	60.097
	10,0	70.549	60.097	81.001
	100,0	74.142	64.670	83.613
6	0,0	174.749	71.194	284.776
	2,5	155.979	80.902	271.831
	10,0	220.054	42.069	362.442
	100,0	155.332	64.722	240.765
18	0,0	113.633	96.416	130.851
	2,5	284.083	223.823	344.343
	10,0	322.822	301.301	344.343
	100,0	451.951	447.646	456.255

Tabelle 14: Medianwerte, Maxima und Minima der adhärennten Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Vorinkubation der Bakterien

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	11.469	11.172	11.766
	2,5	13.197	12.569	13.826
	10,0	23.253	22.624	23.881
	100,0	12.848	8.938	16.759
6	0,0	29.309	678	51.020
	2,5	30.870	2.035	75.987
	10,0	24.085	3.392	55.362
	100,0	30.191	1.357	74.630
18	0,0	12.033	2.514	21.552
	2,5	53.593	20.978	86.209
	10,0	57.473	28.736	86.209
	100,0	62.861	53.881	71.841

Tabelle 15: Medianwerte, Maxima und Minima der invasiven Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Vorinkubation der Bakterien

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
6	0,0	410.466	147.553	751.180
	2,5	305.838	91.215	1.116.040
	10,0	717.646	109.994	1.459.436
	100,0	303.155	174.381	1.073.115
18	0,0	182.667	138.827	226.507
	2,5	1.154.453	730.667	1.578.240
	10,0	1.022.933	730.667	1.315.200
	100,0	1.994.720	1.359.040	2.630.400

Tabelle 16: Medianwerte, Maxima und Minima der freien Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Vorinkubation der Bakterien



Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	82.230	67.113	105.494
	2,5	84.588	54.998	125.221
	10,0	93.647	57.572	209.273
	100,0	105.977	72.366	138.944
6	0,0	177.708	151.555	198.496
	2,5	166.308	130.096	186.426
	10,0	152.225	131.437	167.649
	100,0	177.708	140.825	187.767
18	0,0	96.766	47.939	213.063
	2,5	164.236	52.378	290.742
	10,0	50.602	26.633	284.083
	100,0	421.686	25.967	976.536

Tabelle 17: Medianwerte, Maxima und Minima der adhärenen Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Zugabe der Bakterien zum Zeitpunkt der Infektion

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
1	0,0	10.781	6.353	17.961
	2,5	12.700	4.614	24.672
	10,0	13.600	7.056	37.007
	100,0	27.873	5.156	97.008
6	0,0	28.337	16.112	37.530
	2,5	25.305	23.883	55.158
	10,0	21.324	18.633	27.295
	100,0	25.020	21.988	28.053
18	0,0	12.231	5.918	17.754
	2,5	14.322	7.259	36.297
	10,0	4.478	1.065	10.731
	100,0	12.822	7.891	47.344

Tabelle 18: Medianwerte, Maxima und Minima der invasiven Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Zugabe der Bakterien zum Zeitpunkt der Infektion

Zeit in h	Metronidazolkonzentration in µg/ml	Medianwert	Minimum	Maximum
6	0,0	431.640	355.793	500.593
	2,5	364.757	307.527	797.087
	10,0	561.960	354.414	879.829
	100,0	389.580	297.873	766.748
18	0,0	145.412	74.509	365.333
	2,5	176.057	120.175	317.263
	10,0	141.807	48.671	288.421
	100,0	961.404	151.421	3.845.614

Tabelle 19: Medianwerte, Maxima und Minima der freien Bakterien von *A. actinomycetemcomitans* bei der Zugabe der Bakterien zum Zeitpunkt der Infektion

Zeit in h	Metronidazolkonz. in µg/ml	Ohne Bakterien	P. gingivalis	A. actinomycetemcomitans
1	0,00	0	0,9	0
	0,25 MHK	0	2,5	0
	10,00	0	1,6	0
	100,00	4,1	3,6	0
6	0,00	19	64	0
	0,25 MHK	19	61	0
	10,00	10	98	0
	100,00	29	82	0
18	0,00	103	160	0
	0,25 MHK	125	220	0
	10,00	181	380	0
	100,00	170	420	0

Tabelle 20: Darstellung der IL-8-Konzentrationen in pg/ml bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol

Zeit in h	Metronidazolkonz. in µg/ml	Ohne Bakterien	P. gingivalis	A. actinomycetemcomitans
1	0,00	0	0	0
	0,25 MHK		0	0
	10,00		0	0
	100,00		0,1	0
6	0,00	28	26	0
	0,25 MHK		40	0
	10,00		58	0
	100,00		156	0
18	0,00	56	76,5	0
	0,25 MHK		109,4	0
	10,00		110	0
	100,00		142	0

Tabelle 21: Darstellung der IL-8-Konzentrationen in pg/ml bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol

Zeit in h	Metronidazolkonz. in µg/ml	Ohne Bakterien	P. gingivalis	A. actinomycetemcomitans
1	0,00	0	0	0
	0,25 MHK	0	0	0
	10,00	0	0	0
	100,00	0	0	0
6	0,00	12	19	0
	0,25 MHK	1,5	21	0
	10,00	6	22	0
	100,00	59	22	122
18	0,00	87,7	127	0
	0,25 MHK	64,4	154	0
	10,00	144	309	0
	100,00	154	411	0

Tabelle 22: Darstellung der IL-8-Konzentrationen in pg/ml bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen

Zeit in h	Metronidazolkonz. in µg/ml	Ohne Bakterien	P. gingivalis	A. actinomycetemcomitans
1	0,00	15	20	36
	0,25 MHK	17	16	48
	10,00	16	14	53
	100,00	22	29	34
6	0,00	15	15	30
	0,25 MHK	26	19	50
	10,00	20	16	21
	100,00	36	23	20
18	0,00	16	16	33
	0,25 MHK	18	30	33
	10,00	25	28	29
	100,00	27	42	33

Tabelle 23: Darstellung der TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen in pg/ml bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol

Zeit in h	Metronidazolkonz. in µg/ml	Ohne Bakterien	P. gingivalis	A. actinomycetemcomitans
1	0,00	18	25	27
	0,25 MHK		28	24
	10,00		26	22
	100,00		21	23
6	0,00	14	15	14
	0,25 MHK		16	20
	10,00		18	28
	100,00		19	29
18	0,00	12,8	15,5	13,3
	0,25 MHK		8,6	12,4
	10,00		6,2	16,3
	100,00		1,3	20,3

Tabelle 24: Darstellung der TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen in pg/ml bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol

Zeit in h	Metronidazolkonz. in µg/ml	Ohne Bakterien	P. gingivalis	A. actinomycetemcomitans
1	0,00	5	6	9
	0,25 MHK	11	8	22
	10,00	14	7	20
	100,00	21	10	21
6	0,00	27	29	13
	0,25 MHK	26	26	12
	10,00	24	17	18
	100,00	24	31	19
18	0,00	20,9	44,1	92,1
	0,25 MHK	19,8	47,9	33,7
	10,00	19,6	18,1	42,3
	100,00	17,9	52,9	70,9

Tabelle 25: Darstellung der TGF- $\beta_1$ -Konzentrationen in pg/ml bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen

## Literaturverzeichnis

- Addy M, Rawle L, Handley R, Newmann H, Coventry J. 1982. The development and in vitro evaluation of acrylic strips and dialysis tubings for local drug delivery. *J Periodontol*, 53:696 – 699.
- Albandar J, Olsen I, Gjermo P. 1990. Association between sich DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontol Scand*:415 – 423.
- Armitage G. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4:1 – 6.
- Asikainen S. 1986. Subgingival microflora in relation to clinical conditions in juvenile periodontitis. *Proc Finn Dent Soc*, 82:1 – 66.
- Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L. 1991. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue and saliva. *J Periodontol*, 62:203 – 206.
- Asikainen S, Chen C. 1999. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000, 20:65 – 81.
- Balkwill F, Burke F. 1989. The cytokine network. *Immunol Today*, 9:299 – 304.
- Bartold P, Haynes D. 1991. Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodont Res*, 26:339 – 345.
- Becker W, Becker B. 1993. Treatment of mandibular 3-wall intrabony defects by flap debridement and expanded polytetrafluoroethylene barriere membranes. Long-term evaluation of 32 treated patients. *J Periodontol*, 64:1138 – 1144.
- Beem J, Hurley C, Magnusson I, McArthur W, Clark W. 1991. Subgingival microbiota in squirrel monkeys with naturally occuring periodontal diseases. *Infect Immun*, 59:4034 – 4041.
- Belton CM, Izutsu K, Goddwin P, Park Y, Lamont R. 1999. Fluorescence image analysis of the association between *Porphyromonas gingivalis* and gingival epithelial cells. *Cell Microbiol*, 1:215 – 223.
- Bickel M. 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*, 64:456 – 460.
- Birkedal-Hansen H. 1993. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruktion. *J Periodont Res*, 28:500 – 510.
- Blix I, Hars R, Preus H, Helgeland K. 1992. Entrance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* into HEP-2 cells in vitro. *J Periodontol*, 63:723 – 738.
- Brisette C. 1997. Characterization of the strain-dependent invasion mechanismus and colonial morphology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and the cloning of the recombinase A gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* SUN 465. Burlington: University of Vermont.
- Brisette C, Fives-Taylor P. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* may utilize eiter actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol and Immunol*, 14:137 – 142.

- Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Dominique A, Luc G, Ruidavets J, Poirier O. 1996. Polymorphisms of the transforming growth factor- $\beta$  1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. *Hypertension*, 28:881 – 887.
- Chow A, Bedseroy D, Guze L. 1977. Susceptibility of ablogate anaerobes to metronidazole: an extende study of 1.054 clinical isolates. In: Finegold S, Hrsg. *Metronidazole - Proceedings of the International Metronidazole Conference*. Montreal, Quebec Kanada.
- Courant P, Bader H. 1966. *Bacteroides melaninogenicus* and its products in the gingiva of man. *Periodontics*, 4:131 – 136.
- Darveau R, Belton C, Reife R, Lamont R. 1998. Lokal chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 66:1660 – 1665.
- Dongari-Bagtzoglou A, Ebersole J. 1996. Gingival fibroblast cytokine profiles in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol*, 67:871 – 878.
- Duncan M, Nakao S, Skobe Z, Xie H. 1993. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun*, 61:2260 – 2265.
- Eick S, Pfister W. 2004. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *J Periodontol*, 75:1327 – 1334.
- Eick S, Rödel J, Einax J, Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiology and Immunology*, 17:201 – 208.
- Eick S, Selmann T, Pfister W. 2004. Efficacy of antibiotic strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an in vitro study. *J Clin Periodont*, 31:376 – 383.
- Eley B, Cox S. 2003. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31:105 – 124.
- Erpenstein H, Diedrich P. 2004. *Atlas der Parodontalchirurgie*. Urban & Fischer.
- Fine D, Furgang D, Kaplan J, Charlesworth J, Figurski D. 1999a. Tenacious adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain CU1000 to salivary-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*, 44:1063 – 1076.
- Fine D, Furgang D, Schreiner H, Goncharoff P, J Charlesworth ea. 1999b. Phenotypic variation in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. *Microbiology*, 145:1335 – 1347.
- Fine D, Goncharoff P, Schreiner H, Chang K, Furgang D, Figurski D. 2001. Colonization and persistence of rough and smooth colony variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the mouths of rats. *Arch Oral Biol*, 46:1065 – 1078.
- Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. 1995. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. *Adv Dent Res*, 9:55 – 62.
- Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K, Brisette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontology 2000*, 20:136 – 167.
- Fujihashi K, Kono Y, Beagley K, Yamamoto M, McGhee J, Mestecky J, Kiyono H. 1993. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *J Periodontal*, 64:400 – 406.

- Gemmel E, Marshall R, Seymour G. 1997. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 14:112 – 143.
- Genco R, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon J, Ishikawa I, Listgarten M, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J, Socransky S. 1996. Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*:926 – 932.
- Graves D, Cochran D. 2003. The contribution of Interleukin-1 and Tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74:391 – 401.
- Hamada N, Watanabe K, Aral M, Hiramane H, Umemoto T. 2002. Cytokine production induced by a 67-kDa fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 17:197 – 200.
- Hand W, King-Thompson N, Holman J. 1987. Entry of Roxithromycin (RU 965), Imipenem, Cefotaxime, Trimethoprim, and Metronidazole into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother*, 31:1553 – 1557.
- Harano K, Yamanaka A, Okuda K. 1995. An antiserum to a synthetic fimbrial peptide of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* blocked adhesion of the mikroorganism. *FEMS Microbiol Lett*, 130:279 – 285.
- Heden G, Wennström J, Lindhe J. 1999. Periodontal tissue alterations following Emdogain treatment of periodontal sites with angular bone defects. *J Clin Periodontol*, 26:855 – 860.
- Hefti A. 1993. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontology* 2000, 3:64 – 75.
- Heijl L, Lindhe J. 1979. The effects of metronidazole on the development of plaque and gingivitis in the beagle dog. *J Clin Periodont*, 6:222 – 230.
- Henderson B, Nair SP, and M Wilson JMW. 2003. Molecular Pathogenicity of the oral Opportunistic Pathogen *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol*, 57:29 – 55.
- Hintermann E, Haake S, Christen U, Sharabi A, Quaranta V. 2002. Discrete proteolysis of focal contact and adherens junction components in *Porphyromonas gingivalis* infected oral keratinocytes: a strategy for cell adhesion and migration disabling. *Infect Immun*, 70:5846 – 5856.
- Holla L, Fassman A, Benes P, Halabala T, Znojil V. 2002. 5 polymorphisms in the transforming growth factor- $\beta$  1 gene (TGF- $\beta$  1) in adult periodontitis. *J Clin Periodont*, 29:336 – 341.
- Holttä P, Alaluusua S, Saarela M, Asikainen S. 1994. Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res*, 102:113 – 119.
- Huang G, Kim D, Lee J, Kuramitsu H, Haake SK. 2001. Interleukin-8 and Intercellular Adhesion Molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. *Infect Immun*, 69:1364 – 1372.
- Huard-Delcourt A, Du L, Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, Bonnaure-Mallet M. 1998. Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells: analysis by flow cytometry. *Eur J Oral Sci*, 106:938 – 944.
- Imamura T. 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 74:111 – 118.

- Imamura T, Banbula A, Pereira P, Travis J, Potempa J. 2001a. Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 276:18984 – 18991.
- Imamura T, Potempa J, Pike R, Moore J, Barton M, Travis J. 1995. Effect of free and vesicle-bond cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation: Implications for bleeding tendency at periodontitis site. *Infect Immun*, 63:4877 – 4882.
- Imamura T, Potempa J, Tanase S, Travis J. 1997. Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 272:16062 – 16067.
- Imamura T, Tanase S, Hamamoto T, Pomtempa J, Travis J. 2001b. Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem J*:325 – 331.
- Inouye T, Ohta H, Koikeguchi S, Fukui K, Kato K. 1990. Colonial variation and fimbriation of *A. actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett*, 57:13 – 17.
- Iwase M, Lally E, Berthold P, Korchak H, Taichmann N. 1990. Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun*, 58:1782 – 1788.
- Izutsu K, Belton C, Chan A, Faherazi S, Kanter J, Park Y, Lamont R. 1996. Involvement of calcium interactions between gingival epithelial cells and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 144:145 – 150.
- Kagermeier A, London J. 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains Y4 and N27 adhere to hydroxyapatite by distinct mechanisms. *Infect Immunol*, 47:654 – 658.
- Kaplan J, Schreiner H, Furgang D, Fine D. 2002. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol*, 40:1181 – 1187.
- Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K. 2000. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Med Microbiol*, 49:739 – 745.
- Katz J, Sambandam V, Wu J, Michalek S, Balkovetz D. 2000. Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun*, 68:1441 – 1449.
- Katz J, Yang QB, Zhang P, Potempa J, Travis J, Michalek S, Balkovetz D. 2002. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Infect Immun*, 70:2512 – 2518.
- Kiley P, Holt S. 1980. Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect Immun*, 30:862 – 873.
- Kinane D, Radvar M. 1999. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J Periodontol*, 70:1 – 7.
- Kinane D, Winstanley F, Adonogianaki E, Moughal N. 1992. Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol*, 37:153 – 156.

- Kirby A, Meghji S, Nair S, White P, et al KR. 1995. The potent bone resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *J Clin Invest*, 96:1185 – 1194.
- Kornman K, Page R, Tonetti M. 1997. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000, 14:33 – 53.
- Lally E, Golub E, Kieba I, Taichmann N, Rosenbloom J, Rosenbloom J, Gibson C, Demuth D. 1989. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. Delineation of unique features and comparison to homologous toxins. *J Biol Chem*, 264:15451 – 15456.
- Lally E, Hill R, Kieba I, Korostoff J. 1999. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*, 7:345 – 361.
- Lamont R, Chan A, Belton C, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 63:3878 – 3885.
- Lamont R, Jenkinson H. 1998. Live below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62:1244 – 1263.
- Lamont R, Jenkinson H. 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 15:341 – 349.
- Lamont R, Oda D, Persson E, Persson G. 1992. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol*, 7:364 – 367.
- Lara-Tejero M, Galan J. 2002. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol*, 10:147 – 152.
- Lawson D, Meyer T. 1992. Biochemical characterization of *porphyromonas (bacteroides) gingivalis* collagenase. *Infect Immun*, 60:1524 – 1529.
- Lee JY, Sojar H, Bedi G, Genco R. 1991. *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* Fimbrillin: size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. *Infect Immun*, 59:383 – 389.
- Leiros H, Kozielski-Stuhrmann S, Kapp U, Terradot L, Leonard G, McSweeney S. 2004. Structural Basis of 5-Nitroimidazole Antibiotic Resistance. *J Biol Chem*, 279:55840 – 55849.
- Lepine G, Caudry S, DiRienzo J, Ellen R. 1998. Epithelial cell invasion by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains from restriction fragment-length polymorphism groups associated with juvenile periodontitis or carrier status. *Oral Microbiol Immunol*, 13:341 – 347.
- Lippmann J, Meyer D, Fives-Taylor P. 1996. Microtubules play a role in the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion process. *J Dent Res*, 75:130.
- Loesche W, Syed S, Morrison E, Laughon B, Grossman N. 1981. Treatment of periodontal infections due to anaerobic bacteria with short-term treatment with metronidazole. *J Clin Periodont*, 8:29 – 44.
- Loesche W, Syed S, Schmidt E, Morrison E. 1985. Bacterial profiles of subgingivalplawues in periodontitis. *J Periodontol*, 56:447 – 456.
- Madianos P, Papapanou P, Nanmark U, Dahlen G, Sandros J. 1996. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun*, 64:660 – 664.



- Meyer D, Fives-Taylor P. 1994. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun*, 62:928 – 935.
- Meyer D, Lippmann J, Fives-Taylor P. 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun*, 64:2988 – 2997.
- Meyer D, Mintz K, Taylor P. 1997. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8:389 – 409.
- Meyer D, Rose J, Lippmann J, Fives-Taylor P. 1999. Microtubules are associated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 67:6518 – 6525.
- Meyer D, Sreenivasan P, Fives-Taylor P. 1991. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 59:2719 – 2726.
- Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J, Potempa J. 1998. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: Implication for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett*, 165:411 – 418.
- Miyasaki K. 1991. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol*, 62:761 – 764.
- Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang N. 2002. Local antibiotic therapy guided by microbial diagnosis - treatment of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* persisting after mechanical therapy. *J Clin Periodontol*, 29:743 – 749.
- Momose M, Murata M, Kato Y, Okuda K, Yamazaki K, Shinohara C, Yoshie H. 2002. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  and - $\beta$  1 are released from human cultured gingival epithelial sheets. *J Periodontol*, 73:748 – 753.
- Mueller H. 2001. Checklisten der Zahnmedizin - Parodontologie. Georg Thieme Verlag.
- Mueller H, Heinecke A, Fuhrmann A, Eger T, Zoller L. 2001. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. *J Periodontol Res*, 36:114 – 123.
- Mueller H, Holderrieth S, Burkhardt U, Höffler U. 2002. In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*, 29:736 – 742.
- Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, Kawabata S, Hamada S. 2002. Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. *J Periodont Res*, 37:425 – 432.
- Nishihara T, Ishihara Y, Noguchi T, Koga T. 1989. Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. *J Immunol*, 143:1881 – 1886.
- Nishihara T, Ohsaki Y, Ueda N, Saito N, Mundy G. 1994. Mouse interleukin-1 receptor antagonist induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide blocks the effect of interleukin-1 on bone resorption and osteoclast-like cell formation. *Infection Immun*, 62:390 – 397.
- Nishihara T, Ueda N, Amano K, Ishihara Y, et al HH. 1995. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 capsular-polysaccharide-like polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 $\alpha$  production in mouse marrow cultures. *Infect Immun*, 63:1893 – 1898.

- Njoroge T, Genco R, Sojar H, Genco C. 1997. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun*, 65:1980 – 1984.
- Okada H, Murakami S. 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9:248 – 266.
- Onoe T, Hoover C, Nakayama K, Ideka T, Nakamura H, Yoshimura F. 1995. Identification of *Porphyromonas gingivalis* prefimbriin possessing a long leader peptide: possible involvement of trypsin-like protease in fimbriin maturation. *Microb Pathog*, 19:351 – 364.
- van Oosten M, Notten F, Mikx F. 1986. Metronidazole concentrations in human plasma, saliva and gingival crevice fluid after a single dose. *J Dent Res*, 65:1420 – 1423.
- Page R, Kornman K. 1997. Pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000, 14:9 – 11.
- Page R, Sims T, Engel L, Moncla B, Bainbridge B, Stray J, Darveau R. 1991. The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infection Immun*, 59:3451 – 3462.
- Park Y, Lamont R. 1998. Contact-dependent protein secretion in *porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 66:4777 – 4782.
- Pavicic M, van Winkelhoff A, de Graaff J. 1992. In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother*, 36:2634 – 2638.
- Pickett C, Whitehouse C. 1999. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol*, 7:292 – 297.
- Pike R, McGraw W, Potempa J, Travis J. 1994. Lysine- and arginine-specific preproteinases from *porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J Biol Chem*, 269:406 – 411.
- Potempa J, Agnieszka B, Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000, 24:153 – 192.
- Potempa J, Pike R, Travis J. 1995. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either arg-gingipain or lys-gingipain. *Infect Immun*, 63:1176 – 1182.
- Potempa J, Pike R, Travis J. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. *Biol Chem*, 378:223 – 230.
- Quirynen M, Bollen C, Vandekerckhove B, Dekeyser C, Papaionnou W, Eyssen H. 1995. Full-versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. Short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res*, 74:1459 – 1437.
- Reddi K, Wilson M, Poole S, Meghji S, Henderson B. 1995. Relative cytokine-stimulation activities of surface components of the oral periodontopathic bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine*, 7:534 – 541.

- Rudney J, Chen R, Sedgewick G. 2001. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun*, 69:2700 – 2707.
- Saarela M, Lippman J, Meyer D, Fives-Taylor P. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* *apaH* is implicated in invasion of epithelial cells. *J Dent Res*, 78:259.
- Sanderink R, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R. 2004. *Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie*. Quintessenz Verlags-GmbH.
- Sandros J, Karlsson C, Lappin D, Madianos P, Kinane D, Papapanou P. 2000. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res*, 79:1808 – 1814.
- Sandros J, Madianos P, Papapanou P. 1996. Cellular events concurrent with *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelium in vitro. *Eur J Oral Sci*, 104:363 – 371.
- Sandros J, Papapanou P, Nanmark U, Dahlen G. 1994. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium in vitro. *J Periodont Res*, 29:62 – 69.
- Saxen L, Asikainen S. 1993. Metronidazole in the treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*, 20:166 – 171.
- Schenkein H, Barbour S, Berry C, Kipps B, Tew J. 2000. Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the receptor für platelet-activating factor. *Infect Immun*, 68:5416 – 5419.
- Seymour G, Gemmell E. 2001. Cytokines in periodontal disease: where to from where. *Acta Odontol Scand*, 59:167 – 173.
- Sfakianakis A, Barr C, Kreutzer D. 2001. Mechanisms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of Interleukin-8 in gingival epithelial cells. *J Periodontol*, 72:1413 – 1419.
- Sfakianakis A, Barr C, Kreutzer D. 2002. Localization of the chemokine Interleukin-8 and Interleukin-8 receptors in human gingiva and cultured gingival keratinocytes. *J Periodont Res*, 37:154 – 160.
- Shinn D. 1962. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis. *Lancet*, 1:1191.
- Slot J, Ting M. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *Periodontol 2000*, 20:82 – 121.
- Slots J, Gibbons R. 1978. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. *Infect Immun*, 19:254 – 264.
- Slots J, Ting M. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, 20:82 – 121.
- Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Iontinen Y, Lindy O, Saaris H, Uitto VJ. 1992. Identification of proteases from periodontopathic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast type interstitial collagenases. *Infect Immun*, 60:4491 – 4495.
- Sreenivasan P, Meyer D, Fives-Taylor P. 1993a. Factors influencing the growth and viability of *A. actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*, 8:361 – 369.
- Sreenivasan P, Meyer D, Fives-Taylor P. 1993b. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 61:1239 – 1245.

- Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser M, Probst L, Haffajee A, Socransky S. 1991. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodont*, 18:548 – 554.
- Steinsvoll S, Halstensen T, Schenk K. 1999. Extensive expression of TGF- $\beta$  1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin periodont*, 26:366 – 373.
- Stoltze K. 1992. Concentration of metronidazole in periodontal pockets after application of a metronidazole 25% dental gel. *J Clin Periodont*:698 – 701.
- Takahashi YOS, Scarcez T, Demulder A, Nishihara T, Williams R, Roodman G. 1992. Evidence of an autocrine/paracrine role for Interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone. *endocrinology*, 131:2229 – 2234.
- Tang P, Foubister V, Pucciarelli M, Finlay B. 1993. Methods to study bacterial invasion. *J Microbiol Methods*, 18:227 – 240.
- Teng YT. 2003. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14:237 – 252.
- Tonetti M, Imboden M, Gerber L, Lang N, Laissue J, Mueller C. 1994. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun*, 62:4005 – 4014.
- Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, et al MS. 2001. Expression of IL-1 $\beta$  and IL-8 by human gingival epithel cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine*, 14:152 – 161.
- Ueda N, Nishihara T, Ishihara Y, Amano K, Kuroyanagi T, Noguchi T. 1995. Role of prostaglandin in the formation of osteoclasts induced by capsular-like polysaccharide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. *Oral Microbiol Immunol*, 10:69 – 75.
- Umemoto T, Hamada N. 2003. Characterization of biologically active cell surface components of a periodontal pathogen. The roles of major and minor fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*, 74:119 – 122.
- VanderZee E, Beertsen W. 1997. Cytokine modulate routes of collagen breakdown. Review with special ephasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *J Clin Periodont*, 24:297 – 605.
- Weinberg A, Belton C, Park Y, Lamont R. 1997. Role of fimbriae in *porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 65:313 – 316.
- Wilson M. 1995. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. *Sci Prog*, 78:19 – 34.
- Wilson M, Kamin S, Harvey W. 1985. Bone resorbing activity of purified capsular material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*, 20:484 – 491.
- Wilson M, Schifferle R. 1991. Evidence that the serotype b antigenic determinant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 resides in the polysaccharide moiety of lipopolysaccharide. *Infection Immun*, 59:1544 – 1551.
- van Winkelhoff A, Tjihof C, de Graaff J. 1992. Microbiological and clinical results of Metronidazol plus amoxicillin therapie in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Periodontol*, 63:52 – 57.

- Yilmaz, Watanabe K, Lamont R. 2002. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol*, 4:305 – 314.
- Yilmaz, Young P, Lamont R, Kenny G. 2003. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* infection. *Microbiol*, 149:2417 – 2426.
- Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan M. 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog*, 26:275 – 280.

## Abbildungsverzeichnis

1	Verteilung der Metronidazolösungen auf die KB-Zellen . . . . .	32
2	Verteilung der Bakteriensuspension und des Kontrollmediums auf den Zellen	33
3	Herstellung der Verdünnungsreihe des Interleukinstandards . . . . .	36
4	Porphyromonas gingivalis - Anzahl der adhärenen, invasiven und freien Bakterien bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen. . . . .	40
5	Actinobacillus actinomycetemcomitans - Anzahl der adhärenen, invasiven und freien Bakterien bei der Vorinkubation der Zellen mit Metronidazol. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen . . . . .	41
6	Porphyromonas gingivalis - Anzahl der adhärenen, invasiven und freien Bakterien bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen. . . . .	43
7	Actinobacillus actinomycetemcomitans - Anzahl der adhärenen, invasiven und freien Bakterien bei der Vorinkubation der Bakterien mit Metronidazol. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen. . . . .	44
8	Porphyromonas gingivalis - Anzahl der adhärenen, invasiven und freien Bakterien bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen.	46
9	Actinobacillus actinomycetemcomitans - Anzahl der adhärenen, invasiven und freien Bakterien bei der Zugabe des Metronidazols zum Zeitpunkt der Infektion der Zellen. Dargestellt sind die Medianwerte sowie die Maximal- und Minimalwerte. Die Legende zeigt die verwendeten Metronidazolkonzentrationen. . . . .	47
10	Freisetzung von IL-8 aus KB-Zellen ohne Bakterien (O) und unter dem Einfluss von A. actinomycetemcomitans (Aa) und P. gingivalis (Pg). Die Legende zeigt die Zuordnung der jeweils vier betrachteten aufsteigenden Metronidazolkonzentrationen. . . . .	50
11	Freisetzung von $TGF\beta_1$ aus KB-Zellen ohne Bakterien (O) und unter dem Einfluss von A. actinomycetemcomitans (Aa) und P. gingivalis (Pg). Die Legende zeigt die Zuordnung der jeweils vier betrachteten aufsteigenden Metronidazolkonzentrationen. . . . .	53

## **Danksagung**

Allen, die mir mit ihrer Unterstützung bei der Erstellung dieser Promotionsarbeit geholfen haben, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Besonderer Dank gilt meinen beiden Promotionsbetreuern, Frau PD. Dr. S. Eick und Herrn Prof. Dr. W. Pfister, für die kontinuierliche Unterstützung sowohl bei der Durchführung der mikrobiologischen Versuche als auch bei deren Auswertung.

Den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Mikrobiologie danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, insbesondere gilt mein Dank Herrn F. Rost für die Herstellung der Agar-Platten und Frau F. Linke für das Passagieren der KB-Zellen.

Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei meinen Eltern, Magdalena und Jürgen Stephan, die mich auf meinem ganzen bisherigen Lebensweg immer unterstützt haben.

Dominique Fischer und Sven Bühling danke ich für die zahlreichen Anregungen, die ich von ihnen erhalten habe.

# Lebenslauf

Name: Stephan  
Vorname: Daniela  
Geburtsdatum: 10. Juni 1978  
Geburtsort: Potsdam  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

1985 – 1991 Besuch der 25. POS Berlin-Marzahn  
1991 – 1994 Besuch des 1. Gymnasiums “Georg Friedrich Lichtenberg” in Berlin-Lichtenberg  
1994 – 1998 Besuch des 5. Gymnasiums “Pascal-Oberschule” in Berlin-Lichtenberg  
Juni 1998 Abitur  
1998 – 2004 Zahnmedizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Januar 2004 Abschluss des Zahnmedizinstudiums mit dem Staatsexamen und Erhalt der Approbation  
seit Juli 2004 Ausbildungsassistentin bei ZA Dr. Riedel in Dresden  
2001 Annahme als Doktorandin im Institut für medizinische Mikrobiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
2001 – 2003 Durchführung des experimentellen Teils der Promotionsarbeit  
2004 – 2005 Niederschrift der Dissertation

Dresden, den

Daniela Stephan



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist und ich die Dissertation selbst angefertigt habe. Dabei habe ich alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt: PD Dr. Sigrun Eick, Prof. Dr. Wolfgang Pfister.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde bisher noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht und auch nicht eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Dresden, den .....

Daniela Stephan